

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Cirugía



TESIS DOCTORAL

**Estudio experimental de la utilización de rifampicina
microencapsulada en el polimetilmetacrilato: propiedades
químicas, mecánicas y microbiológicas**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Esther Carbó Laso

Directores

**Pablo Sanz Ruiz
Juan Carlos del Real Romero
Javier Vaquero Martín**

Madrid, 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas

Departamento de Cirugía



**ESTUDIO EXPERIMENTAL DE LA UTILIZACIÓN DE
RIFAMPICINA MICROENCAPSULADA EN EL
POLIMETILMETACRILATO: PROPIEDADES
QUÍMICAS, MECÁNICAS Y MICROBIOLÓGICAS**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE
DOCTOR PRESENTADA POR**

Esther Carbó Laso

Madrid, 2016

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas

Departamento de Cirugía



TESIS DOCTORAL

*Estudio experimental de la utilización de rifampicina
microencapsulada en el polimetilmetacrilato: propiedades
químicas, mecánicas y microbiológicas*

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR PRESENTADA POR

Esther Carbó Laso

Bajo la dirección de los doctores:

**Pablo Sanz Ruiz
Juan Carlos del Real Romero
Javier Vaquero Martín**

Madrid, 2016



D. Javier Vaquero Martín y D. Pablo Sanz Ruiz, Profesores Titulares de Cirugía Ortopédica y Traumatología de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, y D. Juan Carlos del Real Romero, Profesor Propio Adjunto de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería (ICAI), Departamento de Ingeniería Mecánica, Universidad Pontificia Comillas.

HACEN CONSTAR:

Que la Tesis Doctoral que presenta a superior juicio del Tribunal D^a Esther Carbó Laso titulada **“Estudio experimental de la utilización de rifampicina microencapsulada en el polimetilmetacrilato: propiedades químicas, mecánicas y microbiológicas”** ha sido realizada bajo nuestra dirección.

En nuestra opinión el trabajo reúne los requisitos científicos y formales para ser leída y defendida como Tesis Doctoral para optar al Grado de Doctor en Medicina siempre y cuando lo considere el Tribunal designado para tal efecto por la Universidad Complutense de Madrid.

En Madrid, a 15 de Diciembre de 2015

D. Pablo Sanz Ruiz
Director de la Tesis

D. Javier Vaquero Martín
Director de la Tesis

D. Juan Carlos del Real Romero
Director de la Tesis

A mi marido, Pedro

A mi abuelo, José

AGRADECIMIENTOS

A los doctores D. Pablo Sanz Ruiz, D. Javier Vaquero Martín y D. Juan Carlos del Real Romero, cuya dirección, ayuda y sabios consejos han permitido la culminación de esta Tesis.

Al Departamento de Ingeniería Mecánica de la Universidad Pontificia Comillas (ICAI), especialmente a D^a Eva Paz Jiménez, D^a Yolanda Ballesteros Iglesias y D^a Carmen de Pablos Alfaro; y a D^a Francisca Arán Ais, D^a M^a Ángeles Pérez Limiñana y D^a M^a Magdalena Sánchez Navarro, de INESCOP, por el tiempo dedicado y la valiosa ayuda en una parte fundamental de este proyecto.

Al Servicio de Microbiología del Hospital Gregorio Marañón, en especial a D^a Mar Sánchez Somolinos y D^a María Guembe Ramírez por su colaboración amable y desinteresada ayuda en la realización e interpretación de los ensayos microbiológicos.

A D. Javier Corrales, de la empresa SANOFI, por proporcionarnos desinteresadamente parte del material empleado en este trabajo.

A todos mis compañeros del Servicio de Cirugía Ortopédica y Traumatología del Hospital Gregorio Marañón, por su ánimo y por todos los conocimientos transmitidos durante estos cinco años, en especial a D. José Antonio Calvo Haro por sus valiosos consejos. A D. Manuel Villanueva Martínez, por su sincero interés e inestimable ayuda.

A mi familia por haberme ofrecido todas las oportunidades para conseguir mis objetivos, por enseñarme que el esfuerzo siempre lleva consigo una grata recompensa y por confiar en mí y apoyarme en todo momento.

A mis amigas, por saber disculpar mis ausencias y porque, aunque suene a tópico, siempre están ahí.

Por último y de manera muy especial a mi marido, Pedro, tu apoyo ha sido el más incondicional de todos, gracias por calmar mis nervios, darme ánimos y apoyarme en la realización de este trabajo.

“La disciplina es la parte más importante del éxito”

Truman Capote (1924-1984)

ÍNDICE

1	Resumen	1
2	Introducción.....	13
2.1	Infección en artroplastias.....	15
2.1.1	Prevalencia y coste	15
2.1.2	Fisiopatología y biofilm.....	17
2.1.3	Diagnóstico de infección	20
2.1.4	Tratamiento.....	29
2.1.5	Profilaxis.....	37
2.2	Cemento óseo	39
2.2.1	Historia	39
2.2.2	Función del cemento óseo	39
2.2.3	Composición.....	40
2.2.4	Polimerización.....	42
2.2.5	Propiedades del cemento óseo	45
2.2.6	Ensayos mecánicos	50
2.2.7	Uso actual en la fijación de implantes	50
2.2.8	Uso actual en el tratamiento de la infección protésica	52
2.2.9	Antibióticos utilizados en el cemento óseo	54
2.2.10	Utilidad de la rifampicina en la infección periprotésica.....	58
3	Justificación y objetivos	61
3.1	Justificación del estudio.....	63
3.2	Hipótesis de trabajo	64
3.3	Objetivos.....	65
4	Material y método.....	67
4.1	Cemento óseo	69
4.2	Rifampicina	70
4.3	Microencapsulación.....	71
4.3.1	Síntesis y caracterización de las microcápsulas	71
4.3.2	Elución de rifampicina de las microcápsulas en PBS.....	73
4.3.3	Rendimiento de producción de microcápsulas	74
4.3.4	Rendimiento de microencapsulación de rifampicina.....	74
4.3.5	Elución de rifampicina de las microcápsulas en PBS.....	75

4.3.6	Elución de rifampicina del cemento óseo cargado con microcápsulas en PBS	75
4.4	Definición de grupos de estudio	76
4.5	Preparación de las muestras	79
4.5.1	Preparación del cemento con rifampicina	79
4.5.2	Preparación de las muestras para los ensayos de elución en PBS	80
4.5.3	Preparación de las muestras para los ensayos de flexión	82
4.5.4	Preparación de las muestras para los ensayos de compresión	84
4.5.5	Preparación de las muestras para los ensayos de tiempo de fraguado (dureza).....	85
4.5.6	Preparación de las muestras para los ensayos microbiológicos	85
4.6	Equipos y materiales utilizados en los ensayos	87
4.6.1	Ensayos de elución	87
4.6.2	Ensayos de compresión	90
4.6.3	Ensayos de flexión.....	90
4.6.4	Ensayos de dureza	92
4.6.5	Ensayos microbiológicos.....	93
4.7	Control de calidad.....	95
4.8	Análisis de los datos	96
4.8.1	Variables de medición	96
4.8.2	Estadística.....	98
5	Resultados.....	99
5.1	Ensayos de encapsulación	101
5.1.1	Rendimiento de la producción de microcápsulas	101
5.1.2	Contenido de rifampicina en las microcápsulas	102
5.1.3	Rendimiento de microencapsulación de rifampicina.....	103
5.2	Ensayos de elución en PBS	105
5.2.1	Elución de las microcápsulas en PBS.....	105
5.2.2	Eficiencia de la microencapsulación de rifampicina	110
5.2.3	Rendimiento de la encapsulación con PHBV y alginato.....	113
5.2.4	Elución de las microcápsulas de PHBV y alginato en PBS ..	114

5.3 Ensayos de elución en cemento	118
5.4 Ensayos mecánicos	121
5.4.1 Ensayos de compresión	121
5.4.2 Ensayos de flexión.....	122
5.4.3 Ensayos de dureza y tiempo de fraguado	127
5.5 Ensayos microbiológicos	133
6 Discusión	137
6.1 La base del problema: la inhibición de la polimerización del cemento al añadir rifampicina	139
6.2 Vehiculización de la rifampicina	141
6.3 Elución en PBS y en cemento óseo	144
6.4 Ensayos mecánicos	148
6.5 Ensayos microbiológicos	152
6.6 Aplicación clínica del cemento con rifampicina.....	155
6.7 El futuro del cemento con antibióticos	157
6.8 Limitaciones del estudio	160
7 Conclusiones.....	163
8 Bibliografía.....	167
9 Anexo.....	187

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Proceso de formación del biofilm: fases de adherencia, multiplicación, maduración y liberación de bacterias	19
Figura 2. Recambio en un tiempo de prótesis total de cadera cementada infectada	34
Figura 3. Espaciador de cadera en el primer tiempo de un recambio protésico por infección	36
Figura 4. Reacción que da lugar a la polimerización del PMMA	43
Figura 5. Representación de las 4 fases de fraguado del cemento óseo	45
Figura 6. Burbujas formadas durante la polimerización y fraguado del cemento óseo.....	48
Figura 7. Porosidad en cemento óseo mezclado a mano (A) y mezclado al vacío (B)	49
Figura 8. Evolución del sistema de fijación protésica en artroplastias de cadera en mayores de 60 años en Noruega	51
Figura 9. Espaciador de cadera manufacturado con un clavo tipo Steinmann y cemento con antibiótico alrededor	53
Figura 10. “Espaciador” de cemento con antibiótico en una pseudoartrosis séptica	54
Figura 11. Esquema de la molécula de rifampicina.....	70
Figura 12. Rifaldin® 600mg inyectable i.v.....	70
Figura 13. Microcápsulas de rifampicina; A: PHBV, B: ácido esteárico; C: etilcelulosa; D: alginato	73
Figura 14. Elución de rifampicina en función del tiempo para las muestras de microcápsulas de etilcelulosa, ácido esteárico, PHBV y alginato.....	77
Figura 15. Esquema de la forma y dimensiones de las muestras para ensayos de elución en PBS	81
Figura 16. Molde utilizado para fabricar las muestras de cemento para los ensayos de elución	81
Figura 17. Molde sometido a presurización con una mordaza	81
Figura 18. Tubos de ensayo con 5ml de PBS y muestra de cemento con microcápsulas	82

Figura 19. Molde de silicona utilizado para fabricar las muestras para el estudio de resistencia a la flexión	83
Figura 20. Esquema del tamaño y forma de las muestras para el estudio de resistencia a la flexión.....	83
Figura 21. Esquema del tamaño y forma de las muestras para el estudio de compresión.....	84
Figura 22. Molde utilizado para fabricar las muestras para los estudios microbiológicos....	86
Figura 23. Esquema del tamaño y forma de las muestras para los estudios microbiológicos	86
Figura 24. Espectrofotómetro para medir la cantidad de rifampicina en el PBS	87
Figura 25. Espectro UV-Vis de la rifampicina	88
Figura 26. Detalle del espectrofotómetro donde se muestran los dos compartimentos para introducir la muestra blanco y la muestra de interés	89
Figura 27. Máquina de Ensayos Universales ELIB 20W (Ibertest, Madrid, Spain)	90
Figura 28. Máquina de ensayos universal BTH/500 (Ibertest group, Madrid, España).....	91
Figura 29. Esquema de aplicación de la fuerza para el ensayo de flexión en 4 puntos.....	91
Figura 30. Durómetro BAREISS.....	92
Figura 31. Turbidímetro utilizado para preparar muestra de S.aureus	93
Figura 32. Placa de Petri con agar sangre inoculadas con S.aureus y muestra de cemento, antes de la incubación	94
Figura 33. Elución de rifampicina en PBS en cada muestra en los diferentes tiempos de medida (valores medios).....	105
Figura 34. Porcentaje de rifampicina en las diferentes muestras de microcápsulas de PHBV y alginato.....	112
Figura 35. Elución de rifampicina de las microcápsulas de PHBV a lo largo del tiempo	115
Figura 36. Elución de rifampicina de las microcápsulas de alginato a lo largo del tiempo ..	116
Figura 37. Comparación de la elución de rifampicina de las microcápsulas de PHBV y alginato a lo largo del tiempo	196

Figura 38. Perfil de elución de las muestras de cemento con rifampicina sin encapsular.....	202
Figura 39 Perfil de elución de las muestras de cemento con microcápsulas de PHBV con rifampicina.....	204
Figura 40. Perfil de elución de las muestras de cemento con microcápsulas de alginato con rifampicina	206
Figura 41. Concentraciones medias de rifampicina detectadas en PBS con las muestras de cemento en los diferentes momentos de medida	120
Figura 42. Resistencia a compresión de las muestras de cemento en los ensayos de compresión.....	122
Figura 43. Resistencia a flexión de las muestras de cemento en los ensayos de flexión	123
Figura 44. Fuerza máxima de las muestras de cemento en los ensayos de flexión	124
Figura 45. Módulo de flexión de las muestras de cemento en los ensayos de flexión	125
Figura 46. Dureza adquirida por los distintos cementos estudiados a lo largo del tiempo ...	127
Figura 47. Resistencia a flexión de las muestras de cemento a los 45 minutos de la fabricación de las probetas	130
Figura 48. Fuerza máxima de las muestras de cemento a los 45 minutos de la fabricación de las probetas	130
Figura 49. Módulo de flexión de las muestras de cemento a los 45 minutos de la fabricación de las probetas	131
Figura 50. Evolución de la tensión a lo largo del tiempo de fraguado en el cemento con rifampicina sin encapsular	132
Figura 51. Placas de Petri donde se observan los halos de inhibición producidos por las muestras de cemento con microcápsulas de alginato, PHBV y sin microcápsulas	133
Figura 52. Halos de inhibición producidos por el cemento con microcápsulas de alginato, PHBV y rifampicina sin encapsular	135

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Definición de infección periprotésica según el Grupo de Consenso Internacional (adaptación de la definición de la MSIS)	21
Tabla 2. Esquema terapéutico ante la infección periprotésica.....	32
Tabla 3. Factores de riesgo para infección protésica estratificados	189
Tabla 4. Componentes del cemento óseo y sus funciones.....	41
Tabla 5. Tipos de copolímeros presentes en los diferentes cementos comerciales	189
Tabla 6. Algunos cementos comerciales de alta y baja viscosidad	190
Tabla 7. Propiedades que deben cumplir los antibióticos para poder ser usados en el cemento óseo	55
Tabla 8. Parámetros de liberación de distintos antimicrobianos del PMMA	190
Tabla 9. Cementos con gentamicina disponibles en Europa	191
Tabla 10. Propiedades físicas de la rifampicina	59
Tabla 11. Composición del cemento CMW®1	69
Tabla 12. Método para la adición manual del antibiótico según Frommelt	80
Tabla 13. Polímero de cubierta, composición y rendimiento de encapsulación de las diferentes muestras de microcápsulas.....	101
Tabla 14. Concentraciones por triplicado y absorbancia de cada una de las muestras de microcápsulas	191
Tabla 15. Significación estadística entre las concentraciones de rifampicina de las diferentes muestras	192
Tabla 16. Medias, desviación estándar y error estándar de las concentraciones de rifampicina de las diferentes microcápsulas estudiadas	103
Tabla 17. Rendimiento de encapsulación de rifampicina en las diferentes microcápsulas estudiadas.....	104
Tabla 18. Concentraciones medias y desviación estándar de la rifampicina eluida por las diferentes microcápsulas (en los diferentes momentos de medida)	106

Tabla 19. Elución de cada muestra de micropartículas en PBS en los diferentes momentos de medida	193
Tabla 20. Composición y rendimiento de producción de las diferentes muestras de microcápsulas de PHBV	108
Tabla 21. Composición y rendimiento de producción de las diferentes muestras de microcápsulas de alginato.....	109
Tabla 22. Valores medios de las concentraciones, desviación estándar y porcentaje de rifampicina encapsulada en PHBV	110
Tabla 23. Valores medios de las concentraciones, desviación estándar y porcentaje de rifampicina encapsulada en alginato.....	111
Tabla 24. Análisis estadístico descriptivo de las concentraciones ($\mu\text{g/ml}$) de rifampicina de las microcápsulas de PHBV y alginato.....	111
Tabla 25. Absorbancia y concentraciones de rifampicina de cada una de las 8 muestras de las microcápsulas de PHBV	194
Tabla 26. Absorbancia y concentraciones de rifampicina de cada una de las 4 muestras de las microcápsulas de alginato	195
Tabla 27. Rendimiento de encapsulación de rifampicina de muestras de PHBV	113
Tabla 28. Rendimiento de encapsulación de rifampicina de muestras de alginato	113
Tabla 29. Concentraciones medias y desviación estándar de la rifampicina eluída de las microcápsulas de PHBV	114
Tabla 30. Concentraciones medias y desviación estándar de la rifampicina eluída de las microcápsulas de alginato.....	115
Tabla 31. Niveles de significación estadística resultantes de la comparación de las medias de todas las muestras de PHBV y de todas las muestras de alginato, en los diferentes momentos de medida	117
Tabla 32. Niveles de significación estadística obtenidos al comparar la elución de rifampicina en PBS de las diferentes muestras de microcápsulas a las 6h.....	197
Tabla 33. Niveles de significación estadística obtenidos al comparar la elución de rifampicina en PBS de las diferentes muestras de microcápsulas a las 24h.....	198

Tabla 34. Niveles de significación estadística obtenidos al comparar la elución de rifampicina en PBS de las diferentes muestras de microcápsulas a las 48h.....	199
Tabla 35. Niveles de significación estadística obtenidos al comparar la elución de rifampicina en PBS de las diferentes muestras de microcápsulas a la semana	200
Tabla 36. Absorbancia y concentraciones de rifampicina eluída por las microcápsulas de PHBV.....	201
Tabla 37. Absorbancia y concentraciones de rifampicina eluída por las microcápsulas de alginato	201
Tabla 38. Concentraciones medias y desviación estándar de rifampicina eluída de las probetas de cemento con rifampicina, con microcápsulas de PHBV y con microcápsulas de alginato, en los diferentes momentos de medida	118
Tabla 39. Niveles de significación estadística obtenidos al comparar la concentración eluída de rifampicina por las distintas probetas de cemento	119
Tabla 40. Concentraciones y absorbancia de la rifampicina en PBS en cuatro momentos, tras añadir las muestras de cemento con rifampicina sin encapsular	202
Tabla 41. Concentraciones y absorbancia de la rifampicina en PBS en cuatro momentos, tras añadir las muestras de cemento con microcápsulas de PHBV	203
Tabla 42. Concentraciones y absorbancia de la rifampicina en PBS en cuatro momentos, tras añadir las muestras de cemento con microcápsulas de alginato	205
Tabla 43. Resistencia a compresión de los cementos control, con rifampicina sin encapsular, con microcápsulas de PHBV y con microcápsulas de alginato.....	121
Tabla 44. Valores medios de resistencia a la flexión de los cementos estudiados, desviación estándar y reducción de la resistencia respecto al cemento control	123
Tabla 45. Valores medios de la fuerza máxima soportada, desviación estándar y reducción de la fuerza máxima respecto al control	124
Tabla 46. Valores medios de los módulos máximos de flexión, de las probetas de cemento estudiadas, desviación estándar y reducción respecto al control	125
Tabla 47. Ensayos de flexión del cemento control.....	206
Tabla 48. Ensayos de flexión del cemento con rifampicina sin microencapsular	207
Tabla 49. Ensayos de flexión del cemento con microcápsulas de PHBV	207

Tabla 50. Ensayos de flexión del cemento con microcápsulas de alginato	208
Tabla 51. Valores medios de resistencia a la flexión, desviación estándar y reducción de la resistencia de los cementos estudiados respecto al cemento control, a los 45 minutos de la fabricación de las probetas	129
Tabla 52. Valores medios de la fuerza máxima soportada, desviación estándar y reducción de la fuerza máxima respecto al control, a los 45 minutos de la fabricación de las probetas	129
Tabla 53. Valores medios de los módulos máximos de flexión, de las probetas de cemento estudiadas, desviación estándar y reducción respecto al control, a los 45 minutos de la fabricación de las probetas	129
Tabla 54. Ensayos de flexión del cemento control, a los 45 minutos de la fabricación de las probetas	208
Tabla 55. Ensayos de flexión del cemento con rifampicina sin encapsular, a los 45 minutos de la fabricación de las probetas	209
Tabla 56. Ensayos de flexión del cemento con microcápsulas de PHBV, a los 45 minutos de la fabricación de las probetas	209
Tabla 57. Ensayos de flexión del cemento con microcápsulas de alginato, a los 45 minutos de la fabricación de las probetas	209
Tabla 58. Diámetros de los halos de inhibición en cada una de las muestras y lotes..	210
Tabla 59. Valores medios de los halos de inhibición y desviación estándar para cada grupo	133
Tabla 60. Estudios publicados que indican que la rifampicina afecta a la polimerización del PMMA	149

ÍNDICE DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

UFC	Unidades Formadoras de Colonias
MSIS	Sociedad de Infección Músculo Esquelética
ICM.....	International Consensus Meeting
OR.....	Odds Ratio
NNIS	National Nosocomial Infection Surveillance
VSG	Velocidad de Sedimentación Globular
PCR.....	Proteína C Reactiva
IL6	Interleucina 6
¹¹¹ In.....	Indio 111
^{99m} Tc.....	Tecnecio 99 metaestable
PET-FDG.....	Tomografía por Emisión de Positrones con Fluorodeoxiglucosa
PCR.....	Reacción en Cadena de la Polimerasa
VPP	Valor Predictivo Positivo
rDNA	DNA retrotranscriptasa
rRNA	RNA ribosomal
RT-PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real
IFM	Inmunofluorescencia
ELISA.....	Ensayo por Inmunoadsorción Ligado a Enzimas
ADN.....	Ácido Desoxirribonucleico
S	Sensibilidad
E.....	Especificidad
Cmáx.....	Concentración Máxima
CMI.....	Concentración Mínima Inhibitoria
CMB	Concentración Mínima Bactericida

%P/P	Porcentaje del peso
AAOS	Asociación Americana de Cirujanos Ortopédicos
SAMR.....	Staphylococcus Aureus Meticilín-Resistente
SEMR	Staphylococcus Epidermidis Meticilín-Resistente
PMMA	Polimetilmetacrilato
MMA	Monómero de Metacrilato de Metilo
ZrO ₂	Dióxido de Zirconio
BaSO ₄	Sulfato de Bario
ISO/ASTM.....	International Organization for Standarization/American Society for Testing and Materials
p.a.	principio activo
AEDT.....	Ácido Etilendiaminotetraacético
PBS	Tampón Fosfato Salino
PLA.....	Ácido Poliláctico
UV-Vis.....	Espectrofotometría ultravioleta visible
H _D	Unidades de dureza

RESUMEN

ESTUDIO EXPERIMENTAL DE LA UTILIZACIÓN DE RIFAMPICINA MICROENCAPSULADA EN EL POLIMETILMETACRILATO: PROPIEDADES QUÍMICAS, MECÁNICAS Y MICROBIOLÓGICAS

Introducción

La infección periprotésica es una complicación grave cuya prevalencia ha aumentado en las últimas décadas debido al creciente número de artroplastias realizadas. La mayoría de los microorganismos causantes son productores de biofilm, lo que añade una dificultad más al diagnóstico microbiológico y al tratamiento, complicando la acción de los antibióticos. El recambio en dos tiempos es el patrón oro en la infección crónica tardía, implantando, tras la retirada de la prótesis, un espaciador de cemento óseo cargado con antibiótico, lo que permite, además de mantener el espacio articular, alcanzar altas concentraciones de antibiótico localmente. La rifampicina ha mostrado excelente actividad sobre los estafilococos en biofilm y es comúnmente utilizada por vía sistémica en la infección periprotésica, sin embargo, no es posible su uso para la fabricación de espaciadores ya que deteriora las características mecánicas del cemento óseo.

Justificación y objetivos

El cemento óseo puede funcionar como vehículo para liberar altas dosis de antibiótico intraarticulares, sin la toxicidad y los efectos adversos que implicaría la consecución de dichas concentraciones por vía sistémica. La creación de un cemento óseo con rifampicina no es posible debido a que se inhibe la reacción de polimerización

del PMMA, retrasando el fraguado. El aislamiento de la rifampicina durante este proceso de polimerización mediante técnicas de microencapsulación podría permitir diseñar un cemento que eluyese rifampicina localmente sin alterar sus propiedades mecánicas.

Los objetivos de nuestro estudio son los siguientes:

1. La microencapsulación de las partículas de rifampicina
2. La introducción de dichas microcápsulas en el cemento óseo de uso habitual
3. El completo fraguado del cemento en un tiempo razonable
4. La liberación de la rifampicina de las microcápsulas y del cemento
5. La conservación de las propiedades antimicrobianas de la rifampicina liberada frente a *Staphylococcus aureus*

Material y método

Se sintetizaron microcápsulas de rifampicina con alginato, polihidroxibutirato (PHBV), etilcelulosa y ácido esteárico utilizando Rifaldin® 600mg (Sanofi, Barcelona, España) como rifampicina comercial.

Se estudió la concentración y la absorbancia de la rifampicina contenida en las microcápsulas así como la elución en PBS mediante espectroscopía UV-Visible. Las microcápsulas de alginato y PHBV fueron seleccionadas, por sus propiedades de elución, para realizar los ensayos en cemento óseo CMW®1 (DePuy International Ltd., Blackpool, Reino Unido). Se realizaron ensayos de elución en PBS a las 6, 24 y 48 horas, 1 y 2 semanas así como, ensayos de compresión, flexión, dureza y tiempo de

fraguado, comparando el cemento control (sin rifampicina), el cemento con rifampicina sin encapsular, el cemento con microcápsulas de PHBV y con alginato.

La actividad antimicrobiana del cemento con rifampicina sin encapsular y del cemento con microcápsulas de PHBV y con alginato se valoró colocando las muestras en placas de Petri con *S.aureus* ATCC®29213TM y midiendo los halos de inhibición a las 24 horas.

El análisis estadístico se realizó con el paquete informático SPSS versión 22.0 para Mac utilizando el test de ANOVA para medidas repetidas y definiendo como estadísticamente significativa una p menor de 0.05.

Resultados

Las microcápsulas de alginato mostraron mayor elución de rifampicina en PBS que las microcápsulas de PHBV, etilcelulosa y ácido esteárico en todos los momentos ($p=0.0001$). Las muestras de cemento con microcápsulas de alginato eluyeron más rifampicina que las muestras de PHBV y que las de rifampicina sin encapsular ($p<0.02$). Los cementos con microcápsulas de PHBV y alginato mostraron mejores propiedades mecánicas en los ensayos de compresión, flexión y dureza, que el cemento con rifampicina. El tiempo de fraguado disminuyó con la microencapsulación, siendo la curva de dureza similar en el caso del cemento con microcápsulas de alginato y el cemento control. La microencapsulación de la rifampicina no alteró sus propiedades microbiológicas. Los halos de inhibición con cemento con microcápsulas de alginato fueron mayores que con PHBV y con rifampicina sin encapsular ($p=0.0001$).

Discusión

El aumento de la resistencia de los microorganismos y la complejidad de los pacientes ha impulsado el interés por la adición de rifampicina, entre otros antibióticos antiestafilocócicos, al cemento óseo. El retraso en el fraguado y el deterioro de las propiedades mecánicas han sido documentados. Nuestro estudio mostró que la microencapsulación consigue una menor pérdida en la resistencia a la flexión, a la compresión y en la dureza y tiempo de fraguado, persistiendo dentro de los límites adecuados para la fabricación de espaciadores. La preservación de la actividad antimicrobiana de la rifampicina microencapsulada es evidente por los halos de inhibición observados. La principal utilidad que se deriva de este estudio experimental es la posibilidad de obtener un cemento óseo que contenga y eluya rifampicina y que muestre unas propiedades mecánicas válidas para la fabricación de espaciadores de cemento en el tratamiento de las infecciones periprotésicas. A la vista de los resultados, la microencapsulación con alginato sería la mejor opción, por su mejor capacidad de elución y las adecuadas características mecánicas del cemento óseo, aumentando de forma considerable las probabilidades de éxito en el tratamiento de la infección periprotésica.

Conclusiones

1. Técnicamente es posible microencapsular rifampicina con alginato, PHBV, ácido esteárico y etilcelulosa. De la interpretación conjunta de los ensayos de microencapsulación, ensayos de elución y ensayos mecánicos, se concluye que el alginato es el polímero que aporta más ventajas para microencapsular la rifampicina.

2. Es posible la adición de microcápsulas de PHBV y alginato con rifampicina al cemento óseo. Ni éstas ni la rifampicina contenida sufren modificaciones en sus características fisicoquímicas debido a las altas temperaturas alcanzadas durante la polimerización.
3. La microencapsulación de la rifampicina con alginato permite la completa polimerización del cemento óseo en tiempos comparables a los del cemento control (cemento sin antibiótico). Los ensayos mecánicos muestran que el cemento con microcápsulas de alginato y PHBV mantienen propiedades de resistencia adecuadas para su uso clínico, persistiendo valores superiores a los exigidos en las distintas normativas internacionales.
4. La rifampicina es capaz de eluir de las microcápsulas al PBS, detectándose diferentes concentraciones de rifampicina en función del polímero empleado para sintetizar las microcápsulas, siendo más favorable la elución desde las microcápsulas de alginato y PHBV. La rifampicina es capaz de eluir de las microcápsulas y del cemento óseo al PBS, siendo más favorable la elución desde las microcápsulas de alginato que de PHBV.
5. El cemento con microcápsulas de alginato tiene mayor efecto antimicrobiano sobre *Staphylococcus aureus* que el cemento con rifampicina sin encapsular y con microcápsulas de PHBV. Por lo tanto, la técnica de microencapsulación de rifampicina con alginato es un método útil para añadirla al cemento óseo, y hace posible su uso en espaciadores de cemento en infecciones periprotésicas.

EXPERIMENTAL STUDY OF THE USE OF MICROENCAPSULATED RIFAMPICIN IN THE POLYMETHYLMETHACRYLATE: CHEMICAL, MECHANICAL AND MICROBIOLOGICAL PROPERTIES

Introduction

Periprosthetic infection is a major complication, with a raised prevalence in the last decades because of the increased rate of primary arthroplasties. The high susceptibility of implanted devices to infection is due to a locally acquired host defense defect, and persistence is because of the rapid formation of a biofilm resistant to host defense and antimicrobial agents.

Two-stage exchange remains the gold standard for treatment in chronic periprosthetic joint infection. It includes the removal of the prosthesis and the implantation of a temporary antimicrobial-impregnated bone cement spacer that maintains joint space and allows for the direct delivery of antibiotics to the infected tissues.

The role of rifampicin against device-associated staphylococcal infection has been demonstrated. Rifampicin is highly efficient on adherent and stationary-phase staphylococci and is now a standard combination antibiotic in the systemic treatment of periprosthetic infection. However, its addition to bone cement to manufacture spacers is not possible yet, because of the loss of the mechanical properties.

Statement of purpose

Bone cement can function as a vehicle to deliver high doses of antibiotic, without the toxicity and adverse effects that involve systemic antibiotic therapy. Complete curing is prevented when rifampicin is added to PMMA. Isolation of rifampicin during the polymerization process by microencapsulation techniques could allow to manufacture a rifampicin-loaded bone cement that preserve good elution and mechanical properties.

Our objectives are:

1. The microencapsulation of particles of rifampicin
2. The addition of the microcapsules in the bone cement
3. The complete polymerization of bone cement in a reasonable time
4. The release of rifampicin from the microcapsules and bone cement
5. The preservation of antimicrobial properties of rifampicin against *Staphylococcus aureus*

Materials and methods

Microcapsules of rifampicin with alginate, polyhydroxybutyrate (PHBV), ethylcellulose and stearic acid were synthesized using Rifaldin® (Sanofi, Barcelona, Spain).

Concentration and absorbance of the rifampicin contained in the microcapsules and the rifampicin eluted to PBS were studied by UV-visible spectroscopy. The microcapsules of alginate and PHBV were added to bone cement CMW®1 (DePuy International Ltd., Blackpool, Reino Unido). Elution tests in PBS at 6, 24 and 48 hours,

1 and 2 weeks, and compression, bending, hardness and setting time tests were performed. Cement without rifampicin, cement with non-encapsulated rifampicin, PHBV and alginate microcapsules were compared.

The antimicrobial activity of rifampicin bone cement and cement with PHBV and alginate microcapsules was assessed by disk diffusion test with *S.aureus* ATCC®29213™. Diameters of zones of inhibition were measured at 24 hours.

Statistical analysis was performed using SPSS version 22.0 for Mac, using repeated measures ANOVA and considering a p-value less than 0.05 as statistical significance.

Results

Alginate microcapsules showed higher rifampicin elution in PBS than PHBV, ethylcellulose and stearic acid microcapsules over the study period ($p=0.0001$). Cement specimens containing alginate microcapsules eluted more rifampicin than specimens with PHBV and rifampicin ($p<0.02$). Bone cement with alginate and PHBV microcapsules showed improved mechanical properties in compression, bending and hardness tests than cement with non-encapsulated rifampicin. The setting time decreased with microencapsulation and cement with alginate microcapsules achieved similar hardness curve than control cement. Microencapsulation of rifampicin did not modify its microbiological properties. The zones of inhibition for the cement with alginate microcapsules were greater than those for cement with PHBV microcapsules and rifampicin ($p=0.0001$).

Discussion

The marked increase in resistant high-virulence bacteria and patient complexity is drawing the attention toward alternative antimicrobial formulations loaded into acrylic bone cement, as rifampicin and other anti-staphylococcal antibiotics. Delay in setting time and worsening of mechanical properties have been documented. Our study evidence that microencapsulation of rifampicin preserves flexural and compressive strength and setting time, allowing the manufacturing of bone cement spacers.

Preservation of antimicrobial activity of the microencapsulated rifampicin is obvious from the inhibition zones observed. The main benefit to be derived from this experimental study is the possibility of obtaining rifampicin-loaded bone cement that elute high local antibiotic concentrations and maintain suitable mechanical properties to produce cement spacers for the treatment of periprosthetic infections.

According to the results, alginate microencapsulation would be the best choice to introduce rifampicin in bone cement, due to the good elution rate and adequate mechanical properties, improving the success of the treatment of periprosthetic infection.

Conclusions

1. It is technically possible to microencapsulate rifampicin in alginate, PHBV, stearic acid and ethylcellulose. Common data analysis of microencapsulation, elution and mechanical tests, leads to conclude that alginate is the more advantageous polymer to microencapsulate rifampicin.

2. Addition of microcapsules of PHBV and alginate to bone cement is possible. The high temperatures reached during polymerization of bone cement do not affect the physical-chemical properties of microcapsules and rifampicin.
3. Microencapsulation of rifampicin in alginate achieves a setting time similar to control bone cement (bone cement without antibiotic). Mechanical tests show that bone cement with microcapsules of alginate and PHBV preserves adequate strength properties to be used in clinical practice, upholding the values of international standard specifications.
4. Rifampicin is able to elute from the microcapsules, different concentrations of rifampicin are detected in PBS depending on the coating material of the microcapsules. Alginate and PHBV microcapsules show the best elution rates in PBS. Rifampicin is able to elute from the microcapsules and bone cement to PBS. Alginate microcapsules show better elution rates than PHBV in bone cement elution tests.
5. Bone cement with alginate microcapsules exhibits greater antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* than bone cement with non-encapsulated rifampicin and bone cement with PHBV microcapsules. Therefore, microencapsulation of rifampicin in alginate is a useful method to add rifampicin to bone cement in order to manufacture bone cement spacers in periprosthetic infections.

INTRODUCCIÓN

2 INTRODUCCIÓN

2.1 Infección en artroplastias

El aumento de la esperanza de vida de la población, así como el aumento de la demanda funcional en pacientes jóvenes, se está traduciendo en un incremento en el número de artroplastias realizadas en el mundo, lo que conlleva un notable aumento de las complicaciones asociadas a este procedimiento. La infección periprotésica es la complicación más temida para el cirujano y el paciente. La aparición de gérmenes multirresistentes y la complejidad médica de los pacientes obliga a modificar los protocolos de actuación existentes, insuficientes para el óptimo manejo de un problema tan complejo.

El conocimiento de la patogenia de la infección periprotésica y en concreto, de los mecanismos por los cuales los microorganismos colonizan los implantes protésicos, es fundamental para diseñar estrategias útiles de prevención y tratamiento. La capacidad de formar biofilm es un factor de virulencia presente en las bacterias que más frecuentemente causan infección de prótesis articulares. El biofilm no sólo dificulta el diagnóstico, también aumenta la resistencia a los antibióticos y disminuye la respuesta inmune del paciente.

2.1.1 Prevalencia y coste

Aunque la incidencia de la infección protésica es baja, su prevalencia está aumentando debido fundamentalmente a la mayor duración de los implantes y a la mayor esperanza de vida de los pacientes, siendo ambos importantes factores de riesgo de infección tardía y hematógena (203). Los avances en los diseños protésicos, el

perfeccionamiento de la técnica quirúrgica y la mejor utilización de los antibióticos de manera profiláctica aspiran a controlar este problema.

Se estima que la infección ocurre en un 0.5-1% de las artroplastias totales de cadera, 1-2% de las de rodilla, 1% de las de hombro, 5.3-11% de codo, 3.1% de tobillo y 2-8% de las fusiones vertebrales. En las revisiones protésicas, estas cifras ascienden hasta un 5-12% en las series con mejores resultados (210). La prevalencia exacta es desconocida ya que depende de los criterios y las herramientas diagnósticas y del seguimiento de los pacientes. Además los datos varían en función de si se utilizan técnicas de diagnóstico indirecto como la reacción en cadena de la polimerasa o técnicas clásicas como el cultivo.

Según datos del Medicare estadounidense la prevalencia de infección a los dos años tras artroplastia total de cadera en pacientes con una edad media de 65 años es del 1.63%, mientras que entre los 2 y los 10 años es de 0.59% (151). Los datos publicados hace 30 años por la clínica Mayo son similares, con una prevalencia del 1.7% en primarias y 3.2% en revisiones (91). La pérdida de reserva ósea, las repetidas cirugías, la posibilidad de diseminación hematógena y de sepsis ponen en riesgo la función y viabilidad del miembro requiriendo en situaciones extremas la amputación del mismo, y poniendo en peligro la vida del paciente.

Bozic et al. evaluó los costes de 51345 pacientes con infección de una prótesis articular, demostrando que las revisiones por infección suponían el 14.8% de todas las revisiones, una estancia hospitalaria de media de 6 días y un coste de 56087\$ por paciente (25). Kurtz et al. ha mostrado que el número de infecciones tras revisión de cadera se incrementará de 3400 en 2005, a 46000 en 2030, aumentando la revisión séptica de un 8.4% en 2005 a un 47.5% en 2030. De esta forma, se estima que la

infección protésica será la causa más frecuente de revisión en artroplastia en las próximas dos o tres décadas. En EEUU se prevé un aumento de 6400 casos de infección de prótesis de rodilla en 2005 a 175500 en 2030. Se prevé que el gasto económico por infecciones supere el 50% de los recursos hospitalarios disponibles para revisión protésica en 2025 para artroplastias de cadera y en 2016 para artroplastias de rodilla (115).

Las infecciones asociadas a biofilm suponen el 80% de todas las infecciones, lo que se traduce en 17 millones de infecciones, 550000 fallecimientos y 90000 millones de dólares anuales en los EEUU (206).

2.1.2 Fisiopatología y biofilm

El desarrollo de la infección protésica viene determinado por un balance entre el sistema inmunitario del paciente y la virulencia de los microorganismos. La presencia de cuerpos extraños multiplica por 100000 la capacidad de los microorganismos para causar infección crónica (157). Un inóculo bacteriano inferior a 100 UFC/g puede ser suficiente para iniciar una infección protésica. La mayoría de los microorganismos responsables de las infecciones periprotésicas son productores de biofilm (210).

La creación de un biofilm, que recubre y protege la comunicación entre las bacterias en el medio, es la responsable de la difícil penetración de los antibióticos (9). Este biofilm actúa como una barrera protegiendo a las bacterias del sistema inmune, permaneciendo los microorganismos en estado de latencia en un medio de baja oxigenación y pH bajo, así como formando una comunidad donde pueden intercambiar material genético, como genes responsables de resistencias antibióticas (ej. Gen *MecA* confiere resistencia a meticilina).

Esta menor susceptibilidad afecta a todos los antibióticos, pero no repercute en todos por igual. Los más afectados, en el caso del *S. aureus*, que es uno de los microorganismos que más frecuentemente causan infección protésica, son los aminoglucósidos, los glucopéptidos y los betalactámicos, mientras que los menos afectados son las fluorquinolonas, rifampicina, macrólidos, clindamicina y linezolid. El biofilm se forma con rapidez, siendo maduro a los 7 días de evolución.

Las dosis activas de antibiótico in vitro frente a una bacteria con un biofilm maduro es de 200 a 1000 veces superior a la normal. Esto hace imposible el tratamiento adecuado de las infecciones protésicas con antibióticos sistémicos, cuyas dosis necesarias serían tóxicas para el paciente (12).

La presencia de implantes protésicos supone una reducción en el flujo sanguíneo y un menoscabo de la inmunidad local mediante la disminución de la actividad de las células “natural killer”, linfocitos y fagocitos, así como de la liberación de superóxido, un mediador de muerte bacteriana producido por los fagocitos. La liberación de enzimas lisosomales provoca daño en los tejidos adyacentes e insuficiencia vascular local, aumentando las oportunidades de colonización bacteriana y el desarrollo de infecciones crónicas (170).

Los implantes protésicos tienen tendencia a recubrirse de proteínas del huésped, como fibrinógeno y fibronectina, justo después de su implantación. Esta superficie facilita la adhesión bacteriana y la formación de una compleja matriz de polisacáridos que sirve de andamiaje y protección para las propias bacterias. La mayoría de las bacterias (y especialmente los estafilococos) son capaces de producir biofilm. Las bacterias que están dentro del biofilm muestran un fenotipo radicalmente diferente en relación al crecimiento, expresión genética y producción de proteínas comparado con

bacterias idénticas que crecen individualmente (66). La maduración del biofilm implica varios cambios fisiológicos en las bacterias incluyendo factores como “pili”, flagelos y exopolisacáridos (44).

La formación del biofilm consta de varias etapas (Figura 1) (46, 150), comenzando por la adhesión temprana a la superficie del implante, seguido de la proliferación celular en múltiples capas y la adhesión intercelular en una matriz de polisacáridos extracelulares producidos por las bacterias. La adherencia de *S.aureus* depende de la presencia de ligandos en el tejido huésped, tales como fibronectina, fibrinógeno y colágeno. Los implantes protésicos tienen tendencia a recubrirse de estas proteínas del huésped justo después de su implantación.

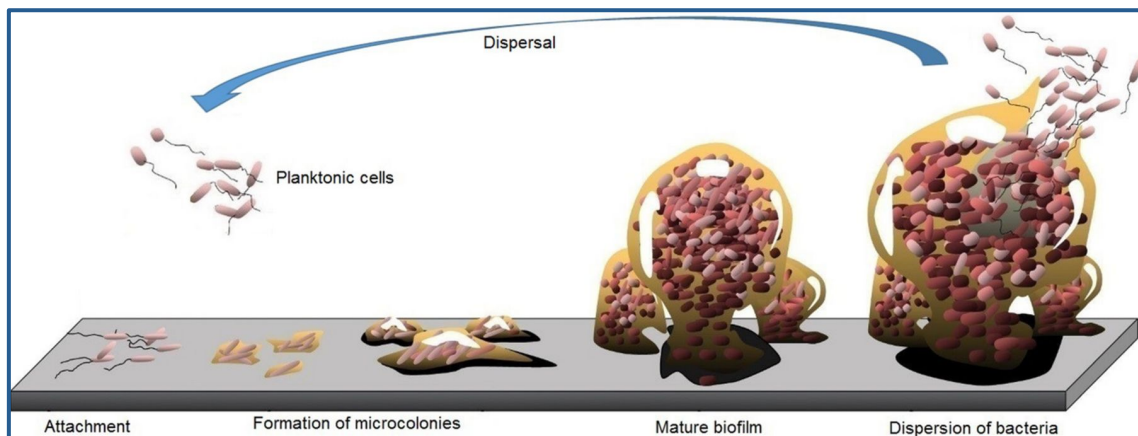


Figura 1. Proceso de formación del biofilm: fases de adherencia, multiplicación, maduración y liberación de bacterias (41)

El proceso de adhesión intercelular es mediado por el polisacárido de adhesión intercelular, codificado por el operon *ica*. La liberación de moléculas que funcionan como señales intercelulares modifican la expresión genética bacteriana, llevando a un

crecimiento bacteriano con baja actividad metabólica y permitiendo la supervivencia bacteriana durante la infección crónica (48). Además las bacterias pueden separarse del biofilm y colonizar otros lugares.

2.1.3 Diagnóstico de infección

La definición propuesta por Ghanem et al. es la más extendida para el diagnóstico de infección de prótesis articular. Uno de los criterios supone el diagnóstico (76):

1. Presencia de un absceso o tracto fistuloso con la articulación.
2. Existencia de un cultivo preoperatorio positivo en medio sólido tras realizar un aspirado intrarticular.
3. Dos o más cultivos positivos intraoperatorios del mismo organismo, o un cultivo positivo asociado a la presencia de pus intrarticular o hallazgos histológicos anormales (6).

Recientemente se ha publicado que la presencia de pus intraarticular no siempre es sinónimo de infección ya que puede aparecer en pacientes con reacción de hipersensibilidad a metales, sin infección (156).

El diagnóstico de infección periprotésica es un reto por la ausencia de estándares definitivos. La Sociedad de Infección Músculo Esquelética (MSIS) ha recomendado unos criterios para definir mejor y diagnosticar la infección periprotésica, criterios que se han sometido a una modificación durante el International Consensus Meeting (ICM) sobre infecciones periprotésicas de 2013 (Tabla 1) (158, 179). El adecuado diagnóstico de infección se basa en una detallada historia clínica, examen físico, resultados serológicos, criterios histológicos y radiografías. Además, el aislamiento del microorganismo es imperativo para el adecuado diagnóstico y éxito terapéutico. Sin

embargo, los tests disponibles para el diagnóstico no son perfectos. Los cultivos, por ejemplo, son negativos en un 7-12% de los pacientes con infección de prótesis articular. La infección periprotésica con cultivos negativos puede complicar la clasificación y manejo del caso, y es una fuente adicional de problemas para el paciente y el cirujano. Los tratamientos antibióticos previos a la toma de muestras son una causa de cultivos negativos. De acuerdo con la definición de infección de prótesis articular, en ausencia de criterios mayores como fístula o 2 cultivos positivos, los resultados serológicos son la base del diagnóstico.

Criterios mayores	2 cultivos positivos para el mismo microorganismo
	Fístula que comunique con la articulación
Criterios menores	1) PCR y VSG elevadas
	2) Leucocitos elevados en líquido sinovial o tira de esterasa leucocitaria ++
	3) Porcentaje de PMN elevado
	4) Análisis histológico positivo para infección periprotésica
	5) 1 cultivo positivo

Tabla 1. Definición de infección periprotésica según el Grupo de Consenso Internacional (adaptación de la definición de la MSIS). Deben cumplirse 1 criterio mayor o 3 de los 5 criterios menores (158). PCR: Proteína C Reactiva; VSG: Velocidad de Sedimentación Globular; PMN: Polimorfonucleares

La falta de cumplimiento de estos criterios no permite descartar el diagnóstico de infección. Algunas infecciones periprotésicas causadas por microorganismos de baja virulencia, como *Propionibacterium acnes*, producen cuadros clínicos larvados y determinaciones analíticas poco sugerentes que precisan más estudios para su diagnóstico (196).

La infección precoz, debido a los síntomas específicos, es la más fácil de diagnosticar. Las infecciones tardías suponen un auténtico reto diagnóstico dada la clínica larvada y la posibilidad de confundirlas con un aflojamiento aséptico o una prótesis dolorosa (128).

Hay una serie de circunstancias que se asocian a mayor riesgo de sufrir una infección de prótesis articular. Con diferencia, el factor de riesgo más importante es haber tenido una infección superficial postoperatoria de la herida quirúrgica, que multiplica el riesgo por 36. Otros factores de riesgo importantes son:

- Puntuación mayor de 2 en el índice de riesgo de infección nosocomial.
- Clasificación operatoria NNIS >2 (OR 3.9).
- Neoplasia concomitante (OR 3.1).
- Artroplastias previas en la articulación (OR 2).
- Otros: diabetes, obesidad, desnutrición, artritis reumatoide, ITU concomitante.

La clasificación que se utiliza actualmente es la de Tsukayama, que distingue cuatro tipos (177):

- Infección posquirúrgica precoz (35%): en el primer mes tras la cirugía.
- Infección crónica tardía (50%): inicio insidioso después del primer mes.
- Infección hematógena aguda (10%): después del primer mes con inicio agudo de los síntomas en una prótesis previamente bien; la fuente de infección es a distancia.
- Cultivos intraoperatorios positivos (5%): en la revisión de una prótesis supuestamente aséptica.

Los microorganismos responsables de estas infecciones son en su mayoría cocos gram positivos. Los estafilococos causan el 60% de las infecciones: los *Staphylococcus coagulasa negativos* (*epidermidis*) son algo más frecuentes que los *Staphylococcus aureus* en términos absolutos (210).

Clínica

En la infección postquirúrgica precoz y en la hematógena aguda predominan los signos inflamatorios locales como celulitis, supuración de herida quirúrgica y dolor articular, pudiendo aparecer también fiebre y afectación sistémica.

En la infección crónica tardía el síntoma más importante es el dolor de características mecánicas o inflamatorias, asociado o no a inflamación local o fístula cutánea. Es frecuente que haya tenido un postoperatorio tórpido con mucha inflamación, dolor, mala cicatrización o infección de la herida quirúrgica.

Serología

Los parámetros más comúnmente empleados en el diagnóstico y monitorización de la infección protésica son la proteína C reactiva (PCR) y la velocidad de sedimentación globular (VSG). Los leucocitos normalmente no sufren elevación.

La PCR es un reactante de fase aguda que alcanza su pico a los 2-3 días de la cirugía y se normaliza entre los 14-21 días posteriores. Unos niveles por encima de 10 pg/ml a los 14-21 días de la cirugía, presentan un 93% de sensibilidad y un 83% de especificidad para el diagnóstico de infección protésica (45).

La VSG es un marcador de inflamación no específico que se eleva tras la cirugía, presenta sus máximas cifras a los 5-7 días y vuelve a sus valores habituales entre los 3 meses y 1 año. La persistencia de elevación por encima de 30 mm/hora al año presenta una sensibilidad del 82% y una especificidad del 87% para el diagnóstico de infección de artroplastia de rodilla (83). El problema en su uso radica en que se eleva también en procesos inflamatorios además de los infecciosos.

Recientemente se ha propuesto la interleucina 6 (IL6) como parámetro inflamatorio que puede ayudar al diagnóstico de infección protésica. Esta interleucina estimula a las células hepáticas a la producción de PCR. Su elevación tiene un pico a las 6-12 h, volviendo a la normalidad a las 48-72 h. Si consideramos el límite de 10 pg/ml presenta una sensibilidad del 100% y especificidad del 95% para el diagnóstico de infección en artroplastia de rodilla (51). No es fiable cuando el paciente presenta enfermedades inflamatorias crónicas ya que se encontrará elevada. Se cree también que el uso de antibióticos antes de la cirugía puede elevarla.

En la práctica clínica se combinan la VSG y la PCR como marcadores de infección, presentando una sensibilidad y especificidad altas. En ausencia de inmunodeficiencia, si ambos valores son normales, tienen un valor predictivo negativo para descartar infección de 0.99. La IL6, dado su elevado precio, se ha limitado a fines experimentales.

Pruebas de imagen

Las radiografías simples valoradas de forma aislada no son útiles para el diagnóstico de infección protésica. Algunos signos que sugieren infección son la formación ósea perióstica, focos de osteolisis y/o reabsorción del hueso subcondral, pero aparecen de forma tardía por lo que no sirven para el diagnóstico. Además, las radiolucencias pueden producirse en procesos no sépticos. La utilidad de las radiografías es su valoración seriada para identificar el desgaste o la osteolisis.

La gammagrafía de triple fase con Tecnecio-99 (^{99m}Tc) es un procedimiento simple y muy sensible pero que puede dar falsos positivos ya que no distingue entre aflojamiento aséptico o infección (123). Dado su alto valor predictivo negativo, es útil como prueba de cribado (186). El leucoscan con leucocitos marcados con Indio-111 (^{111}In) es más sensible pero menos específico. El uso combinado de ambas pruebas presenta una capacidad de detección de infección del 95% (189).

La tomografía por emisión de positrones con fluorodeoxiglucosa (PET-FDG) no permite distinguir entre infección y aflojamiento aséptico por lo que no se usa de rutina. Presenta una sensibilidad del 91% y una especificidad del 72% para el diagnóstico de infección protésica (209).

Reinartz en un meta-análisis establece la precisión de la gammagrafía con ^{99m}Tc , el leucoscan con ^{111}In y el PET-FDG para el diagnóstico de una infección protésica en el 81%, 84% y 83% respectivamente (169).

Aspirado articular y anatomía patológica

La artrocentesis o aspirado articular es un procedimiento sencillo que habitualmente no necesita control ecográfico, salvo en la cadera. Debe obtenerse suficiente cantidad de líquido articular como para poder enviar dos muestras a microbiología (una para recuento celular absoluto, diferencial y bioquímica, y otra para cultivo) y otra muestra a anatomía patológica. Si el paciente está siendo tratado con antibióticos, esto puede ocasionar la aparición de falsos negativos por lo que siempre que la situación clínica del paciente lo permita, es útil suspender los antibióticos varios días antes de la artrocentesis. La reacción de cadena de polimerasa (PCR) puede ayudar a evitar estos falsos negativos o a identificar patógenos que requieran cultivos prolongados en medios especiales de enriquecimiento, pero tiene otros problemas como la necesidad de especialización, falsos positivos y falta de disponibilidad en muchos laboratorios. En artroplastia de rodilla, la presencia de más de 1700 leucocitos/ml o más del 65% de neutrófilos sugiere infección; en cadera, se precisan más de 3200 leucocitos/ml o más del 80% de neutrófilos. En prótesis de rodilla se ha establecido que un recuento leucocitario mayor de 1100 leucocitos/ml presenta una sensibilidad del 95% y una especificidad del 94% para el diagnóstico de infección. Si a esto añadimos un recuento diferencial de neutrófilos superior del 91%, el valor predictivo positivo (VPP) es del 98.6% (76). El test de Gram presenta una pobre rentabilidad diagnóstica (141).

En caso de existir una fístula, el cultivo del exudado es poco útil para el diagnóstico de infección protésica. Únicamente en fístulas de poco tiempo de evolución y cultivos positivos para *S.aureus* podría ser fiable el resultado.

Los cultivos intraoperatorios son considerados el patrón de oro para el diagnóstico de infección protésica. Se deben tomar mínimo cinco muestras: líquido

articular antes de abrir la articulación, membrana sinovial, hueso periarticular, material protésico retirado, cotilo y fémur o fémur y tibia, cavidad endomedular de fémur o tibia, etc. Lo ideal es tomar cada muestra con un bisturí diferente y enviar las muestras lo antes posible al laboratorio. Siempre que sea posible hay que suspender la antibioticoterapia dos semanas antes. Si se quiere emplear profilaxis antibiótica, ésta debe administrarse después de tomar las muestras, aunque esta práctica está siendo cuestionada desde la utilización de estudios de biología molecular (32). Cuando se retira parte o todo el material protésico, éste debe enviarse para realizar la sonicación y el cultivo o PCR del líquido de sonicado. La sonicación es un procedimiento que emplea ultrasonidos para separar el biofilm de la prótesis, cultivándose posteriormente aumentando sustancialmente la rentabilidad del estudio. Los resultados de los cultivos pueden tardar entre dos y cinco días, pudiendo sufrir alguna contaminación en ese tiempo (15). La sensibilidad del cultivo de las muestras intraoperatorias oscila entre 65 y 94%. El 10% de las infecciones protésicas se pueden presentar con cultivos negativos.

En algunos centros existe la posibilidad de hacer un análisis histológico rápido a través de cortes congelados, enviando muestras de tejidos durante la intervención quirúrgica. Esto puede ayudar a tomar decisiones importantes como pueden ser implantar una prótesis definitiva o un espaciador. Los criterios no son uniformes, no obstante la presencia de más de cinco neutrófilos por campo de alto aumento (400x) en cinco campos presenta una sensibilidad de 25% y una especificidad del 95% (140).

Diagnóstico molecular

Las técnicas de diagnóstico molecular están permitiendo optimizar el diagnóstico de la infección protésica. Se han de destacar la reacción en cadena de la polimerasa universal 16S (rDNA, rRNA) y la reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (RT-PCR). Entre los métodos microscópicos actualmente disponibles, el de inmunofluorescencia (IFM) parece ser el más apropiado. Este método no está basado en el cultivo y se está trabajando para simplificarlo. Una prueba de IFM rápida capaz de detectar la infección durante el procedimiento quirúrgico sería un gran soporte para elegir el tratamiento más adecuado. También se ha descrito un método serológico eficaz mediante ELISA inmunoglobulina G (IgG) anti-lipoteicoico (135). El rendimiento de estas pruebas está aún por definir.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) amplía el ADN bacteriano permitiendo la detección de bacterias, ya sean vivas o restos de ellas, con obtención de resultados más precozmente que con el cultivo simple, a las 12-13 horas. Esta anticipación diagnóstica permite una adecuación del tratamiento antibiótico y quirúrgico que reduce el consumo de antibióticos de amplio espectro y además lleva consigo la disminución de la morbi-mortalidad asociada al diagnóstico tardío. Además no se ve afectada por el tratamiento antimicrobiano previo (porque se hayan administrado antibióticos de amplio espectro hasta la obtención de los cultivos definitivos, o bien porque se hayan administrado antibióticos de amplio espectro de forma innecesaria) aunque presenta el inconveniente de ampliar no sólo el ADN de los microorganismos causantes de la infección sino también de cualquier contaminante presente en la muestra, pudiendo producir falsos positivos (155).

Las técnicas de inmunofluorescencia permiten distinguir entre los organismos pertenecientes al biofilm y aquellos otros organismos que actúan como contaminantes (135).

La sonicación es un procedimiento que emplea ultrasonidos para romper el biofilm formado alrededor de los implantes retirados en las revisiones protésicas. De esta forma, según Trampuz et al. aumenta el número de bacterias disponibles para los cultivos microbiológicos, consiguiendo una sensibilidad y especificidad del 78.5% y 98.8% frente al 60.8% y 99.2% que presentan los cultivos convencionales. La ultrasonicación de largo tiempo es una mejora de la técnica convencional que produce lisis bacteriana, permitiendo obtener mayor cantidad de material genético donde poder realizar una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y conseguir un diagnóstico molecular de la infección (193).

Algunos estudios recientes han demostrado que la determinación de la proteína C reactiva (PCR) y de IL-6 en líquido sinovial predicen adecuadamente infección. La IL-6 en líquido articular es un buen predictor de infección con una S 87% y E 100%. La determinación de PCR en líquido articular tiene una S 76% y una E 93%, mejor que en suero (24).

2.1.4 Tratamiento

El tratamiento de la infección protésica depende de factores relacionados con el paciente: generales (edad, estado de salud y comorbilidades) y locales (presencia de fístula, estado de las partes blandas, existencia de colgajos, pérdida o no de reserva ósea, etc.), y factores relacionados con la infección: tiempo desde el inicio de los síntomas o microorganismo responsable. La clasificación de Tsukayama tiene valor pronóstico y

ayuda a decidir qué tipo de tratamiento es el más adecuado en cada caso (63, 103, 177, 205).

Ante una infección precoz, está recomendada la retención del implante, irrigación (con 5-6 litros de suero) y desbridamiento amplio y cambio de los componentes modulares (en las prótesis de rodilla el polietileno, y en las de cadera la cabeza femoral y el inserto habitualmente). Son candidatos los pacientes con cuadros clínicos que no superen las 3 semanas de evolución. La probabilidad de curar la infección, sin retirada de la prótesis, está en relación con el tiempo de evolución de la infección y por tanto con el grado de desarrollo del biofilm. Lo ideal es hacerlo dentro de las 48 horas que siguen al diagnóstico. Es fundamental tomar muestras protocolizadas para el diagnóstico microbiológico durante el desbridamiento quirúrgico. Hasta el resultado de las muestras intraoperatorias se deben utilizar antibióticos empíricos de amplio espectro (144).

La duración del tratamiento antibiótico en las infecciones causadas por estafilococos y estreptococos será de 6 semanas en caso de infección de una prótesis total de cadera y 3 meses en prótesis total de rodilla (26). En el caso de infección enterocócica, la duración se prolongará en todos los casos a 3 meses (ya que no disponemos de antibióticos bactericidas para este microorganismo), aunque estos protocolos se encuentran en continua modificación.

Si las muestras tomadas durante un recambio protésico de un aflojamiento supuestamente aséptico resultan positivas (lo que Tsukayama denomina cultivos intraoperatorios positivos o infección tipo IV) debe mantenerse la antibioterapia durante un mínimo de 6 semanas (129).

En el caso de una infección crónica tardía, el tratamiento más aceptado es el recambio en dos tiempos. En algunas situaciones especiales puede llevarse a cabo un recambio protésico en un tiempo (33).

En la infección hematógena aguda tardía existe mayor controversia, existiendo autores que prefieren tratarla como una infección precoz y por tanto, realizar un desbridamiento y cambio de partes móviles, sabiendo que la tasa de éxito es inferior a la de la infección postquirúrgica precoz (197). Otros autores prefieren tratarla como una infección tardía (156, 157).

El objetivo del tratamiento de la infección de prótesis articular es erradicar la infección y preservar la función de la articulación. En algunas ocasiones no se pueden conseguir estos objetivos y se pueden plantear procedimientos de salvamento: la artroplastia de resección, la amputación o el tratamiento supresor crónico con antibióticos.

La artroplastia de resección es una opción en pacientes inmunodeprimidos graves o adictos a drogas por vía parenteral en los que la probabilidad de éxito tras el implante protésico es muy baja. La antibioticoterapia supresora indefinida está indicada cuando existe una contraindicación formal para la cirugía por edad o enfermedad de base, en pacientes encamados o que no precisan una prótesis funcionante, cuando hay falta de consentimiento del paciente para realizar la intervención, o bien en una infección precoz con implante estable y un microorganismo tratable con antibióticos orales tras desbridamiento agresivo con recambio del polietileno (194). La última opción terapéutica es la amputación del miembro, reservada sólo para casos en los que hay una infección no controlable con riesgo vital. En la Tabla 2 se muestra el esquema terapéutico.

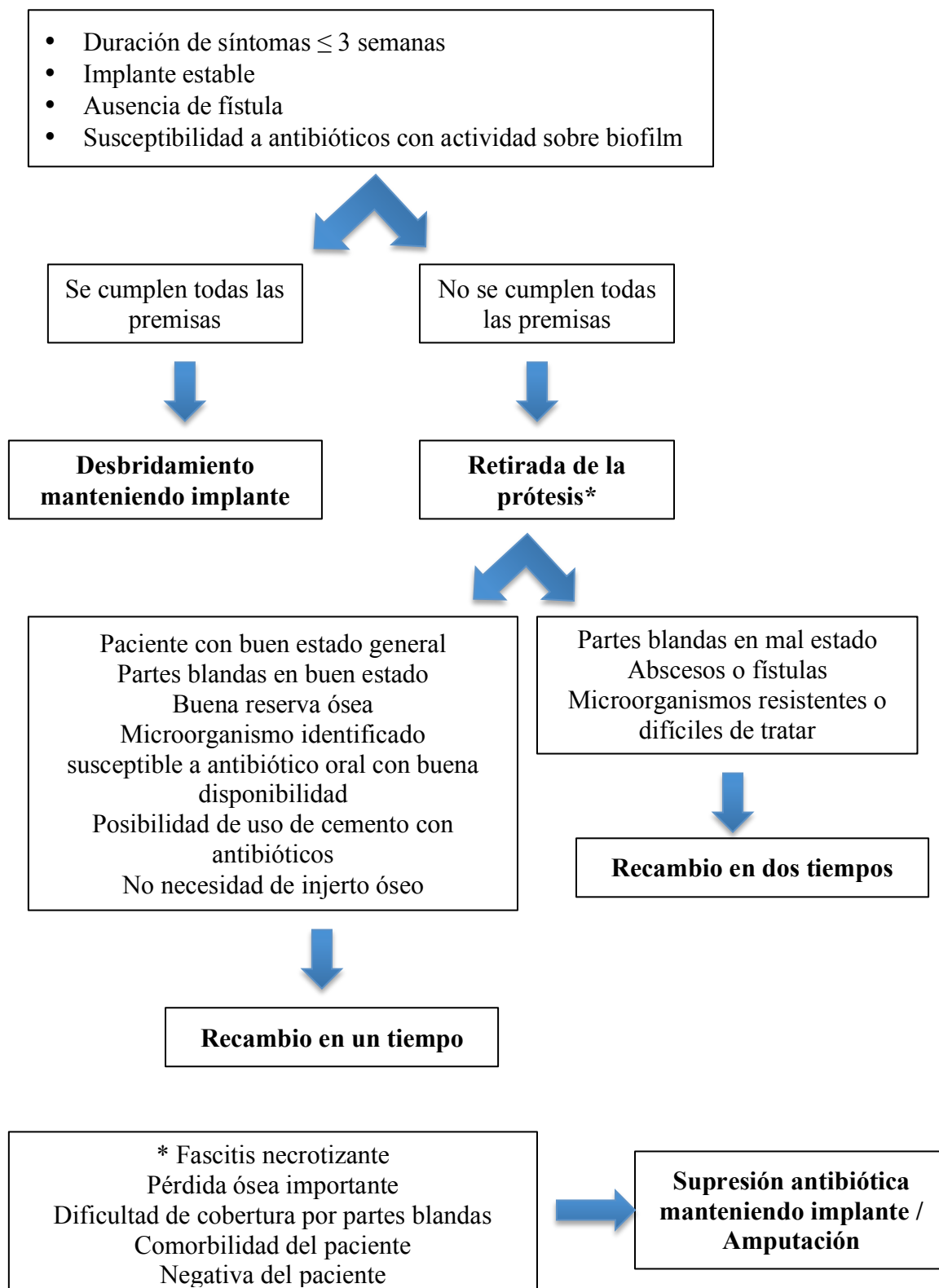


Tabla 2. Esquema terapéutico ante la infección periprotésica

Recambio en un tiempo

Consiste en desbridar e implantar una segunda prótesis en el mismo acto quirúrgico seguido de un período de antibioticoterapia que puede prolongarse 6-12 semanas, primero empírica y luego según antibiograma. El recambio en un tiempo utilizando cemento con antibiótico fue popularizado en Europa por el profesor H. W. Bucholz y la escuela de la Endoklinik, en Alemania, siendo una opción en pacientes inmunocompetentes con infección aguda por microorganismos sensibles a antibióticos de primera línea (Figura 2) (33, 165). Recientemente, la fijación no cementada ha demostrado baja tasa de recurrencia y una alta tasa de consolidación ósea (61, 88). Aunque la adición de grandes cantidades de antibiótico en el cemento óseo se considera uno de los pilares fundamentales de esta forma de tratamiento, el recambio en un tiempo con fijación no cementada de los nuevos componentes parece augurar buenos resultados.

El recambio en un tiempo presenta como principales ventajas que el reimplante es más fácil y la recuperación funcional mejor y más rápida. La tasa de curación según distintas series varía entre el 86-100% (72). Elson publicó una tasa de fracaso con el recambio en un tiempo del 12.4% y con el recambio en dos tiempos del 3.5% (57). Resultados similares obtuvo Garvin et al. (73) con una tasa de recurrencia del 10.1% y del 5.6% respectivamente. Göksan et al. (79) publicó su experiencia cuando se hace una correcta indicación quirúrgica, con tasas de éxito superiores al 83% en un seguimiento de 5 años.

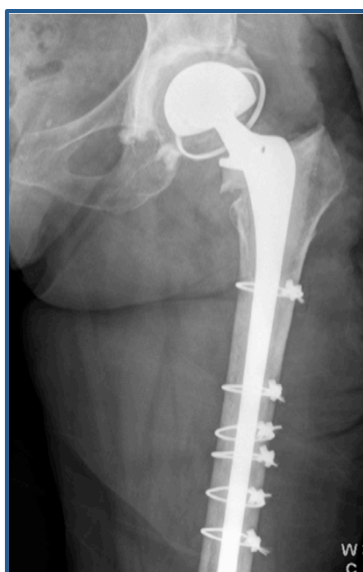


Figura 2. Recambio en un tiempo de prótesis total de cadera cementada infectada

Recambio en dos tiempos

El recambio en dos tiempos es el patrón de oro en la infección crónica tardía o en el fracaso del tratamiento de la infección precoz o hematógena (103, 198). Los pasos a seguir son los siguientes:

1) Retirada inicial de la prótesis, desbridamiento amplio y toma de muestras para cultivo (incluyendo sonicación de prótesis). Para retirar la prótesis y todo el tejido infectado puede ser necesario realizar abordajes ampliados, mejorando la exposición y previniendo fracturas no controladas. La osteotomía ampliada de trocánter facilita la extracción del vástago en la cadera, sin aumentar el riesgo de osteomielitis o las tasas de recurrencia de la infección (143).

2) Colocación de un espaciador, articulado o no, impregnado de antibiótico. Permite mantener la longitud del miembro, mejora el control de las partes blandas y libera antibiótico localmente (Figura 3).

3) Antibioterapia sistémica seis semanas. Hasta que se obtienen los resultados del antibiograma se administra antibioterapia empírica, por ejemplo vancomicina 1g/12h, cefepima 2g/12h y gentamicina 5mg/kg peso/24h, por vía parenteral. Cuando existe un antibiótico eficaz por vía oral, hay series que solo mantienen el tratamiento intravenoso durante dos semanas, seguido de un protocolo de antibióticos orales durante 6-12 semanas.

Durante este tiempo se debe monitorizar la VSG y PCR hasta que se normalizan. El segundo tiempo quirúrgico se suele realizar entre las ocho y doce semanas del primer tiempo. Antes de realizar la segunda cirugía, hay que suspender los antibióticos y observar el comportamiento de los marcadores séricos durante dos semanas. Su elevación o la aparición de signos de infección sobre la herida son datos de no curación de la infección. En algunos casos la VSG y la PCR no llegan a normalizarse a pesar de encontrar luego en la cirugía cultivos estériles (181). Los cultivos del líquido articular, previos a la reimplantación de la prótesis definitiva, deben ser negativos.

4) Retirada del espaciador y colocación de nueva prótesis. Se deben tomar nuevos cultivos intraoperatorios y si siguen siendo positivos, continuar la antibioterapia 4-6 semanas más. Si son negativos se considera curada la infección.

La reconstrucción protésica puede realizarse con implantes cementados o no cementados (61, 88). La tasa de curación está cercana al 90% (131, 174, 192). La aparición de nuevos gérmenes multi-resistentes está causando alarma. Parvizi et al.

(159) examinaron el resultado de las infecciones causadas por *Staphylococcus aureus* meticilin resistente (SAMR), con una tasa de éxito de sólo el 75%.

La recurrencia de la infección después de un recambio en dos tiempos es una situación difícil con un pronóstico variable y en general desfavorable. Se puede realizar un nuevo recambio en dos tiempos, no obstante si fracasa, la resección (cadera) y la artrodesis (o estabilización en extensión en rodilla) son los procedimientos que más garantías dan para resolver la infección, aunque con resultados funcionales pobres.



Figura 3. Espaciador de cadera en el primer tiempo de un recambio protésico por infección

Antibióticos

La elección de la antibioticoterapia óptima está mejor definida en las infecciones por estafilococos que por otros microorganismos. Los regímenes que incluyen rifampicina han demostrado excelente actividad sobre los estafilococos de crecimiento lento del biofilm en estudios in vitro, en animales vivos y en estudios clínicos (78, 117,

157, 204). Siempre debe usarse en combinación con otros antibióticos, como las quinolonas, cotrimoxazol, ácido fusídico, minociclina o linezolid, para prevenir el desarrollo de resistencias (65). La combinación de fluorquinolona y rifampicina ha demostrado ser un factor pronóstico favorable en el tratamiento de la infección periprotésica (111, 211). No se han descrito efectos secundarios importantes ni interacciones farmacológicas relevantes (211) aunque existe preocupación por la disminución de la eficacia de la terapia con linezolid cuando éste se usa en combinación con rifampicina (56). La dosis diaria y la frecuencia de administración óptimas no se conocen. La actividad de la rifampicina se basa en el cociente $C_{\text{máx}}/C_{\text{MI}}$.

2.1.5 Profilaxis

Existen diversas medidas para disminuir la incidencia de la infección protésica. Antes de la cirugía, es necesario identificar los factores del huésped corregibles que aumentan el riesgo de infección (Tabla 3, en Anexo). Los antibióticos profilácticos, administrados una hora antes de la incisión, son efectivos para la prevención de la infección de la herida quirúrgica. Rosemberg et al. (171) describieron un protocolo de administración de antibiótico los 3 meses previos a la cirugía, disminuyendo el uso de antibióticos perioperatorios, aunque este procedimiento no se ha implantado en la práctica habitual. Se discute la duración adecuada de la profilaxis antibiótica. En la actualidad no hay datos que justifiquen una duración que supere el tiempo de cirugía, o como máximo, las 24 horas siguientes.

La Academia Americana de Cirujanos Ortopédicos (AAOS) ha publicado que los betalactámicos (cefazolina como primera elección) son los antibióticos más apropiados para la profilaxis de la infección de prótesis articular (1, 2, 62). En pacientes

alérgicos deben ser sustituidos por la clindamicina o la vancomicina. La vancomicina debe ser de primera elección en centros con elevada prevalencia de SAMR o de SEMR (*Staphylococcus epidermidis* meticilin resistente) superiores al 25% y en pacientes colonizados por SAMR (87, 107, 110, 166, 182). Estudios comparativos entre cefalosporinas y glucopeptidos no han demostrado diferencias significativas en cuanto a eficacia. Las cefalosporinas son más baratas y mejor toleradas, los glucopeptidos no se deben usar indiscriminadamente por el riesgo de inducir resistencias en gram positivos.

2.2 Cemento óseo

2.2.1 Historia

El polimetilmetacrilato (PMMA) fue descubierto en Alemania en 1902 por los químicos alemanes Otto Röhm y Walter Bauer, quienes lo utilizaron para la creación de un plástico en láminas transparentes denominado inicialmente “Plexiglás®”. En 1936 la compañía Kulzer lo patentó (patente DRP 737058). Los hermanos Judet (106) fueron los primeros en intentar fabricar prótesis articulares de “Plexiglás®”, sin embargo, fracasaron al no poder integrarse en el cuerpo, debido a razones mecánicas y biológicas. El primer implante fijado con cemento fue realizado por E. J. Haboush para fijar una prótesis de vitalio en 1951 (86). En la década de 1950-1960, Sir John Charnley ancló la primera prótesis de cabeza femoral con PMMA auto-polimerizado (37), el llamado Un-Life, un material que se usaba en la reparación dental. Charnley denominó al material “cemento óseo con base acrílica” y describió su técnica quirúrgica (40). En 1966, la empresa CMW comenzó a suministrar el primer cemento óseo esterilizado, formulado específicamente para la cirugía protésica articular (39).

2.2.2 Función del cemento óseo

El cemento transfiere las cargas desde el implante hasta el hueso, rellenando los espacios entre ambos y absorbe el impacto, amortiguando la transmisión de fuerzas y repartiéndolas a lo largo de toda la interfaz. La mayoría de los cementos muestran propiedades adhesivas durante el fraguado pero esta propiedad se pierde inmediatamente al finalizar esta fase.

Los implantes cementados pueden transmitir cargas sostenidas en un área mayor que los no cementados, ya que tienen dos interfaces, la unión implante-cemento y hueso-cemento, siendo ambas fundamentales para conseguir la estabilidad mecánica. La técnica de cementación es fundamental para una apropiada interdigitación del cemento. Charnley (36) demostró que el área de interfaz de un vástago femoral cementado era aproximadamente 83.9 cm², 65 veces mayor que en los vástagos no cementados. La calidad de la aposición entre el implante-cemento y hueso-cemento es fundamental para la supervivencia de la prótesis (164).

Otra característica fundamental del cemento acrílico es su capacidad para liberar fármacos como pueden ser antibióticos. Se pueden añadir de forma manual durante la preparación del cemento aunque también existen formas comerciales. Permiten alcanzar concentraciones locales de antibiótico mucho mayores a las obtenidas con su administración por vía sistémica, lo cual es fundamental para superar la concentración mínima bactericida y ser eficaces en el tratamiento de las infecciones periprotésicas y de las pseudoartrosis infectadas. En la misma filosofía, se han realizado ensayos clínicos con cemento impregnado de drogas citotóxicas en cirugía oncológica (109).

2.2.3 Composición

Cada kit comercial consiste en un paquete individual de polvo y un vial de líquido, que se esterilizan mediante irradiación gamma y ultrafiltración o bien, con gas de óxido de etileno, según las recomendaciones de cada fabricante.

Los componentes de la mayoría de los cementos óseos y sus funciones se detallan en la Tabla 4.

Componente	Función
<i>POLVO</i>	
1. Polímero de polimetilmetacrilato	
2. Co-polímero de metacrilato	Altera las propiedades físicas del cemento
3. Peróxido de benzoilo	Iniciador. Reacciona con el DmpT para catalizar la polimerización
4. Sulfato de bario (BaSO ₄) o dióxido de zirconio (ZrO ₂)	Elemento radiopaco
5. Aditivos plásticos (dicitclohexil ftalato)	
6. Antibióticos	Profilaxis o tratamiento de infección
<i>LÍQUIDO</i>	
1. Monómero de metilmetacrilato (MMA)	
2. N,N-Dimetil-p-toluidina (DmpT)	Activador. Inicia el fraguado del polímero (activador)
3. Hidroquinona	Inhibidor. Estabiliza evitando polimerización precoz
4. Colorante	Distingue cemento del hueso (ej. clorofila)

Tabla 4. Componentes del cemento óseo y sus funciones

El tipo de copolímero utilizado en el componente en polvo así como la relación de éste con el polímero, es una de las diferencias que caracteriza las diferentes marcas comerciales de cemento (97) (Tabla 5, en Anexo).

Lee y Wrighton (119) observaron que grandes cantidades de monómero líquido se evaporaban durante el mezclado a alta velocidad, pero la dureza del cemento no se afectaba significativamente. El polvo puede incluir una pequeña cantidad de monómero residual que suele suponer un 2-6% en el momento inicial, cantidad que se reduce al 0.5% en las siguientes 3 semanas. Una pequeña parte se libera y se metaboliza a dióxido de carbono y agua en el ciclo de Krebs. Hace años se relacionó el monómero liberado con descompensación cardiorrespiratoria que se producía en algunos pacientes (113). Es posible que durante la preparación del cemento algo de monómero no polimerice

completamente quedando de forma residual. El cemento insuficientemente mezclado se relaciona con “zonas vacías” y debilitamiento del cemento.

Todos los cementos óseos contienen un 8-15% de opacificador. El dióxido de zirconio (ZrO_2) y el sulfato de bario (BaSO_4) son los elementos radiopacos más frecuentemente utilizados. Permite monitorizar radiológicamente el cemento e identificar fallos en el mismo. No se integra en las cadenas del polímero pero se distribuye de manera uniforme a lo largo de la matriz polimerizada. Se ha observado mayor osteolisis cuando se utiliza sulfato de bario en estudios animales y estudios sobre cultivos celulares. Los iones de bario son poco hidrosolubles a pesar de lo cual pueden liberarse a la sangre si se produce un aflojamiento del implante. El óxido de zirconio proporciona mayor radiopacidad, pero como desventaja tiene mayor poder abrasivo (172).

2.2.4 Polimerización

La reacción de polimerización comienza cuando se mezclan el polvo y el líquido (Figura 4).

Los radicales de benzoilo son capaces de iniciar la polimerización formando enlaces covalentes en el MMA. Esta reacción forma cadenas poliméricas lineales que alcanzan pesos moleculares de 10^5 - 10^6 g/mol. Al aumentar la viscosidad de la mezcla, la movilidad del monómero disminuye y se detiene la polimerización como consecuencia de la ausencia de radicales (96).

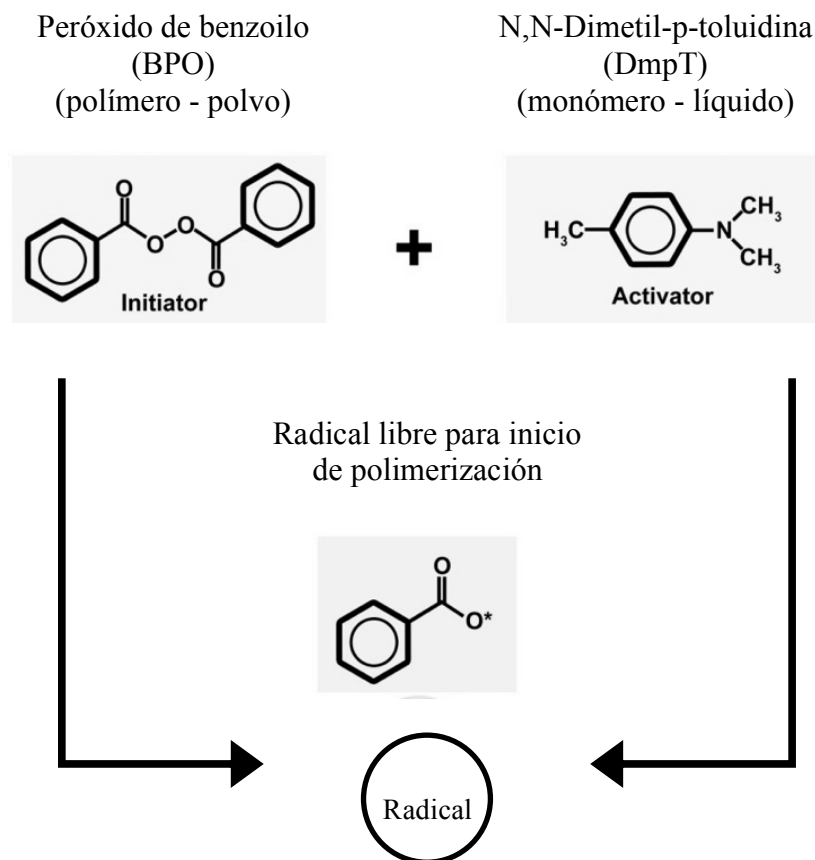


Figura 4. Reacción que da lugar a la polimerización del PMMA

Es una reacción química exotérmica que aumenta la temperatura según aumenta la viscosidad y se lleva a cabo la polimerización, generando 57 KJ de calor por mol de MMA polimerizado. In vitro, el pico de temperatura alcanza 113°C. El pico máximo de temperatura de acuerdo con las normas ISO 5833 (152) y ASTM F451:99 (133) es aproximadamente 60-80°C. La elevación de temperatura también depende de otros factores como el ratio polvo/líquido y la velocidad de polimerización. Los cementos tradicionales, con un ratio polvo/líquido de 40g/20ml muestran una temperatura similar de 105°C. Los cementos llamados de “baja temperatura” oscilan entre 70-90°C (27). El pico de temperatura se observa durante un corto periodo de tiempo mientras el cemento polimeriza. La teórica necrosis ósea endóstica consecuencia del calor se ha relacionado

con el aflojamiento aséptico del implante y con la aparición de una reacción de tejido conectivo alrededor de un implante aflojado. Se han utilizado varios métodos para reducir la temperatura de fraguado del cemento (monómeros de alto peso molecular, aumento del ratio polvo/líquido y adición de agua al líquido) pero todos disminuyen la resistencia mecánica (187). La adición de antibióticos también disminuye el pico de temperatura alcanzado. No hay ensayos clínicos que demuestren los beneficios de disminuir la temperatura alcanzada en la supervivencia de los implantes cementados.

En vivo, la temperatura alcanzada es mucho menor ya que el cemento se utiliza en forma de finas capas (21) y el hueso y la prótesis actúan como disipadores térmicos (167, 191). Además la circulación sanguínea actúa como refrigerador (116). La adecuada técnica quirúrgica con preservación del hueso esponjoso hace poco probable que se alcance la temperatura a la cual las proteínas se coagulan. Varios ensayos clínicos demuestran un pico de temperatura intraoperatorio de 40-46°C que corresponde a una capa de cemento óseo puro de 3 mm o menos de grosor sin interdigitación en hueso esponjoso (54).

La polimerización implica una contracción de volumen debido a que lleva consigo la conversión de un gran número de moléculas de monómero en moléculas de polímero y disminuye la distancia molecular. Esta contracción es de aproximadamente el 21%. Es decir, con 100 ml de MMA líquido se obtendrían 79 ml de PMMA sólido. La realidad en vivo es menor (6-7%) ya que las moléculas de aire presentes en la mezcla no se comprimen. Esto explica la mayor contracción volumétrica del cemento mezclado al vacío frente al mezclado a mano. La pérdida de este volumen durante el fraguado se compensa por la expansión del cemento al absorber agua.

2.2.5 Propiedades del cemento óseo

La viscosidad es la propiedad más importante en la preparación del cemento para el cirujano y determina las propiedades de trabajo del cemento (163). De acuerdo a la norma ISO 5833, cada compañía debe presentar una gráfica de los efectos de la temperatura sobre la duración de las fases de preparación del cemento (Figura 5).

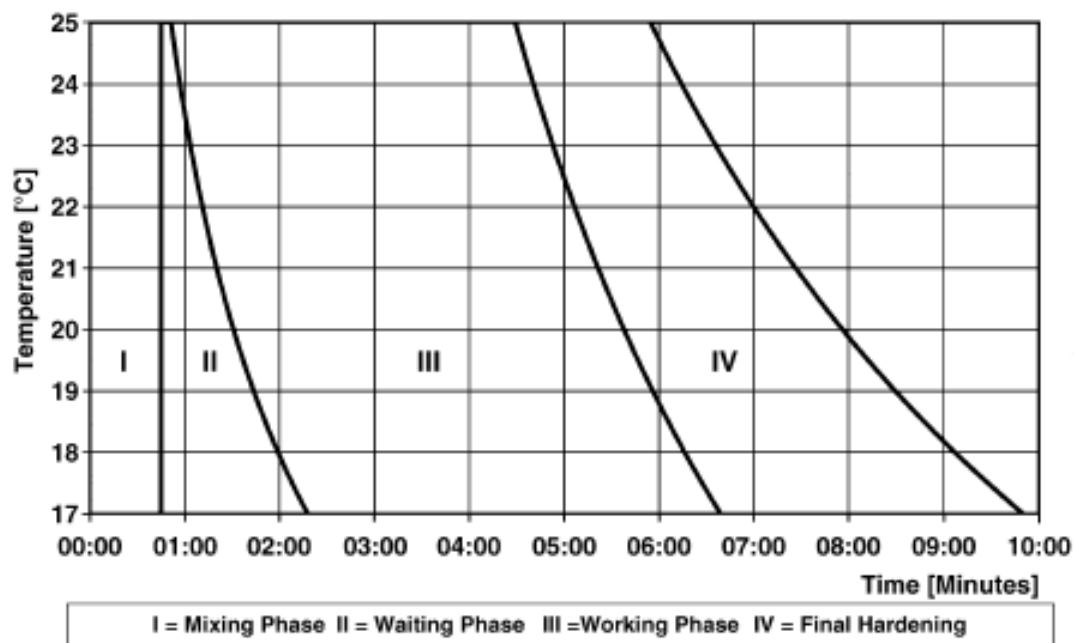


Figura 5. Representación de las 4 fases de fraguado del cemento óseo (112)

La viscosidad hace referencia a las características de manipulación y viene determinada por la relación polímero/monómero. Esta relación no debe intentar manipularse en quirófano, lo único que puede hacerse es modificar la temperatura de los componentes ya que la velocidad de reacción y la viscosidad dependen de la temperatura. Existen diferentes marcas comerciales de cementos de alta y baja viscosidad (Tabla 6, en Anexo).

Se distinguen cuatro fases diferentes en la preparación del cemento con sus correspondientes viscosidades (112). La duración de cada fase depende del preparado comercial y de la temperatura.

- Fase de mezclado (hasta 1 minuto): se mezcla el componente líquido con el sólido hasta conseguir una mezcla homogénea.
- Fase de espera (variable): hasta que el cemento deja de estar pegajoso.
- Fase de trabajo (2-4 minutos): momento de aplicación del cemento e implantación de la prótesis.
- Fase de endurecimiento (1-2 minutos): polimerización y liberación de calor.

Aunque casi todos los cementos óseos comerciales están compuestos de PMMA y cumplen unas estrictas normas de calidad, existen diferentes formas de modificar las propiedades mecánicas del cemento.

Estas propiedades pueden clasificarse en intrínsecas (dependientes de la composición del cemento) y extrínsecas (dependientes de las condiciones de preparación) (101).

Intrínsecas

Los componentes con bajo peso molecular facilitan la difusión del monómero, aumentando la resistencia a la fatiga (85). La presencia de antibiótico en el cemento modifica sus propiedades físicas. La cantidad de antibiótico suele limitarse a menos de 1g por 40g (2.5% P/P). Dunne et al. (53) mostró la disminución de los ciclos de fatiga de Palacos® R tras añadir 0.5g de gentamicina. Lewis (120) demostró que la resistencia del cemento se veía afectada cuando la cantidad de antibiótico era mayor del 1.85% del

polvo. Hsieh et al. (98) estableció en 8 g la cantidad de antibiótico que impedía fraguar al cemento.

La presencia de un 8-15% de sustancia radiopaca disminuye la resistencia a tracción en un 8% si lo comparamos con el cemento sin contraste (mayor disminución con dióxido de zirconio) (77).

La proporción monómero/polímero (líquido/polvo) también modifica las propiedades, pero esto no debe hacerse en el quirófano. Belkoff et al. demostró que si se aumentaba la relación recomendada por el fabricante de 0.45 a 1 ml/g, disminuía la resistencia a la compresión y aumentaba el tiempo de fraguado (18).

Extrínsecas

Uno de los factores que influye negativamente en el comportamiento mecánico es la porosidad que se produce durante su preparación en el quirófano (suele alcanzar el 7-10%). En el mezclado a mano, disminuyendo el número de batidos y esperando un corto tiempo, tras humedecer el componente en polvo con el monómero, la porosidad del cemento puede reducirse a un 5%. La evaporación del monómero en el interior del material durante la polimerización y posterior fraguado también puede producir pequeñas burbujas (Figura 6) (10).

La centrifugación tras el mezclado a mano disminuye la porosidad al 1% o menos. La viscosidad del cemento debe ser baja para que las burbujas de aire fluyan a la superficie del cemento por la fuerza centrífuga. El centrifugado conlleva una distribución no homogénea de las partículas radiopacas debido a la diferencia en la densidad de estas partículas y el monómero MMA y el PMMA. El mezclado al vacío

también disminuye la porosidad a menos del 1%, aumentando sus propiedades de fatiga y limitando la exposición a vapores.

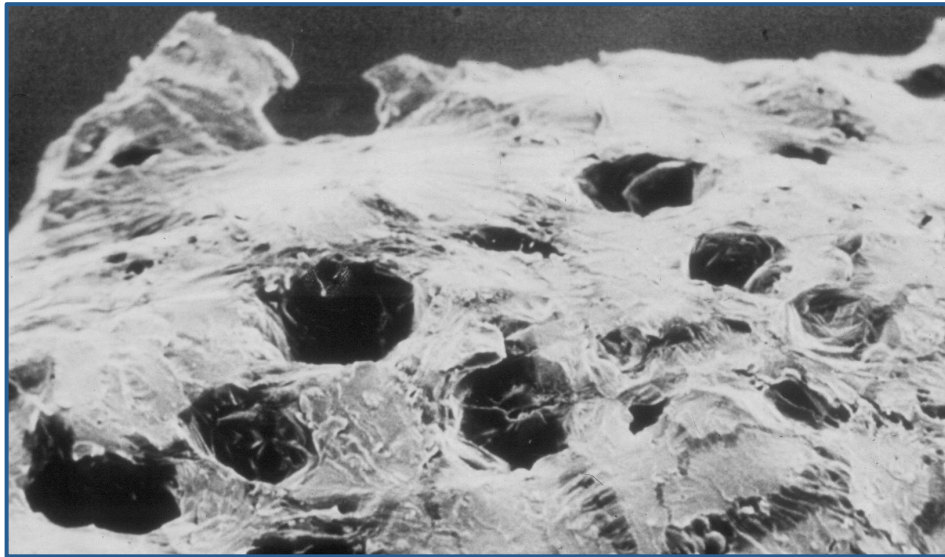


Figura 6. Burbujas formadas durante la polimerización y fraguado del cemento óseo (10)

La información toxicológica indica que el monómero MMA es perjudicial cuando se inhala, se deglute o se absorbe a través de la piel (97). Messik et al. (139) encontró que esta técnica no consigue una baja porosidad de forma uniforme. También se ha demostrado que el mezclado al vacío puede asociarse con la presencia de roturas en el cemento. No se han encontrado diferencias en la resistencia del cemento mezclado al vacío frente al mezclado a mano, debido al aumento de porosidad por un mezclado rápido necesario para conseguir una mezcla homogénea (122) (Figura 7).

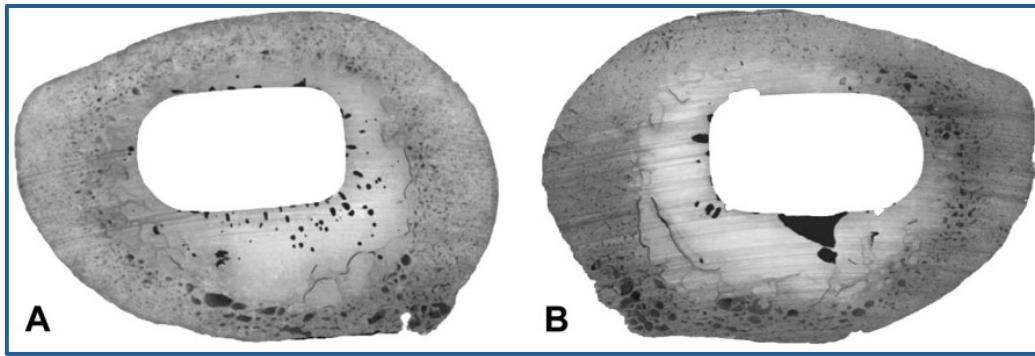


Figura 7. Porosidad en cemento óseo mezclado a mano (A) y mezclado al vacío (B)

Los líquidos corporales son absorbidos por el cemento durante 4-8 semanas (113) lo que se traduce en una disminución de la resistencia a la compresión y a la tensión (122).

Cuanto mayor es la temperatura durante la fase de mezclado, mayor velocidad de polimerización disminuyendo así el tiempo de trabajo (146). Por esto el enfriamiento de los componentes del cemento de alta viscosidad enlentece su polimerización (38, 101).

La esterilización también puede modificar las propiedades del cemento. Puede ser por radiación o por gas (óxido de etileno). La radiación puede ser gamma y beta, es la más frecuentemente utilizada pero reduce el peso molecular del PMMA, disminuyendo la resistencia a la fatiga. El óxido de etileno es más lento y más caro pero no tiene efecto sobre el peso molecular (93). El PMMA no puede ser re-esterilizado con calor porque desactiva el peróxido de benzoilo produciendo el fracaso de la polimerización (101).

2.2.6 Ensayos mecánicos

Se utilizan diferentes parámetros para evaluar las propiedades mecánicas, definidos por normas internacionales o estándares nacionales. En 1976, la ASTM (American Society for Testing and Materials) publicó el primer estándar para cemento óseo (F451-76), que fue la base para la norma ISO 5833/1 publicada en 2000. Actualmente, las especificaciones para cementos óseos son ISO 5833:2002 y ASTM F451. Estas normas contienen requerimientos y métodos de evaluación, relacionados con resistencia a compresión tras 24 horas. La resistencia a compresión debe ser al menos 70 MPa. Deben definirse también el módulo de flexión (≥ 1800 MPa) y la resistencia a la flexión (≥ 50 MPa). Además se define el tiempo de polimerización, temperatura máxima alcanzada, empaquetamiento y etiquetado del cemento. Los ensayos preclínicos tienen como intención predecir el comportamiento clínico de los cementos óseos, sin embargo, el cumplimiento de estas normas no asegura el éxito clínico (173), debido a que sus propiedades cambian bajo condiciones fisiológicas (temperatura corporal y fluidos) por lo que carecen de relevancia clínica (114).

2.2.7 Uso actual en la fijación de implantes

El PMMA tiene la capacidad de rellenar los huecos entre el hueso nativo y el implante consiguiendo que la transmisión de fuerzas sea más fisiológica. La correcta técnica de cementación es la clave para su eficacia (164). Se han publicado tasas de éxito superiores al 90% a 15 años (45, 101). Su combinación con antibióticos ofrece una excelente oportunidad para la profilaxis de la infección protésica pero existe controversia sobre su uso generalizado. Para la profilaxis primaria, la dosis establecida es menos de 1 g de antibiótico por 40 g de cemento óseo (contenido de una bolsa) (104).

Algunos autores no recomiendan su uso basándose en la reducción de sus propiedades mecánicas y en la aparición de resistencias a antibióticos. Estaría justificado en pacientes con alto riesgo quirúrgico, ancianos, inmunodeprimidos, diabéticos, antecedentes de infección periprotésica y enfermedades como artritis reumatoide o malnutrición (90). La Academia Americana de Cirujanos Ortopédicos (AAOS) ha editado guías que únicamente indican su uso en pacientes con alto riesgo de infección protésica (92).

El uso del cemento con antibiótico en la profilaxis primaria de la infección protésica (105) es una práctica habitual en Reino Unido, Escandinavia (60) (Figura 8) y el oeste europeo que se está transmitiendo a EEUU. Parvizi et al. (159) realizó en 2008 un meta-análisis donde concluyó que el uso de cemento con antibiótico como profilaxis disminuye la tasa de infección en artroplastias primarias en un 50% y en revisión tras aflojamiento aséptico en un 40%.

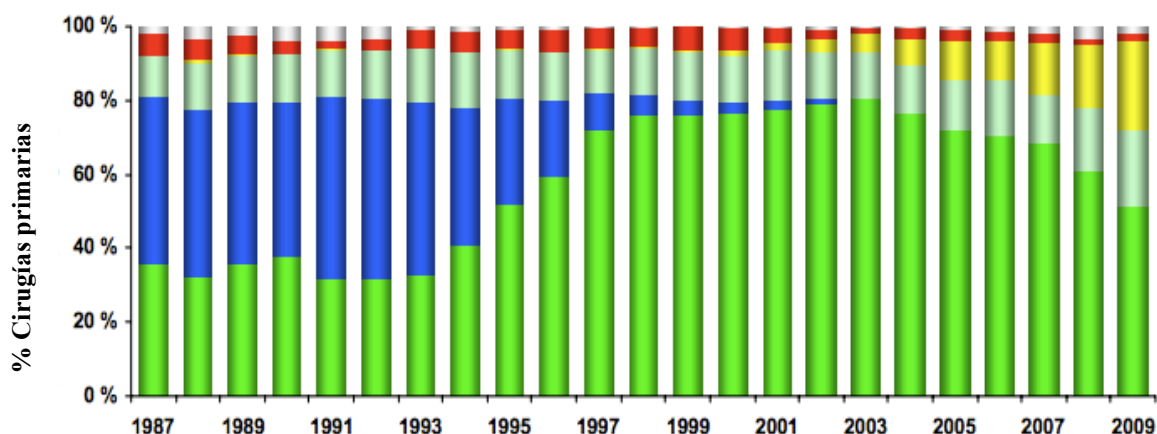


Figura 8. Evolución del sistema de fijación protésica en artroplastias de cadera en mayores de 60 años en Noruega (168); verde: cemento con antibiótico, azul: cemento sin antibiótico

2.2.8 Uso actual en el tratamiento de la infección protésica

Mader et al. (126) publicó que al administrar antibióticos de forma sistémica a dosis habituales, las concentraciones locales en el sitio de la infección no excedían el 10% de los niveles alcanzados en sangre, siendo esta cantidad insuficiente para erradicar la infección.

Se necesitan mínimo 3.6 g de antibiótico por 40 g de cemento para obtener buenos niveles de elución de antibiótico del cemento óseo y conseguir así niveles terapéuticos de antibiótico local. Para la fabricación de espaciadores se emplean dosis de 6-8 g por paquete de 40 g. Se ha demostrado que estas cantidades son seguras (184). Si se pretendieran conseguir las mismas concentraciones locales de antibiótico utilizando antibioticoterapia sistémica se sobrepasarían los umbrales tóxicos.

Los espaciadores pueden ser de distintos tipos (6, 23, 42, 125, 199). En EEUU no es raro utilizar como espaciador en la cadera un vástago metálico pequeño y un inserto de polietileno, ambos recubiertos de cemento con antibiótico salvo en la zona articular (6, 199). Los espaciadores manufacturados tienen superficies muy rugosas que teóricamente aumentan la liberación de antibiótico (81). La opción más económica consiste en espaciadores realizados manualmente en el quirófano (199, 200), con tasas de curación del 96% en las primeras series (Figura 9). Presentan como principal ventaja la posibilidad de “personalizarlos”, añadiendo los antibióticos más eficaces contra determinada infección. Los espaciadores pueden ser articulados o estáticos. Los segundos se indican cuando hay gran pérdida ósea o destrucción de las partes blandas, o bien es un paso previo a la fusión o estabilización en extensión, en el caso de la rodilla. En esta situación un bloque de cemento puede utilizarse en la rodilla mientras

que en la cadera se utiliza un disco para el acetábulo y una espiga de cemento para rellenar el canal femoral.



Figura 9. Espaciador de cadera manufacturado con un clavo tipo Steinmann y cemento con antibiótico alrededor

También se usa el cemento óseo como relleno de defectos óseos en pseudoartrosis sépticas, alcanzando concentraciones elevadas de antibióticos en los tejidos blandos adyacentes (técnica de membrana inducida) (47, 95, 130, 131, 142, 190, 208) (Figura 10).



Figura 10. Espaciador de cemento con antibiótico en una pseudoartrosis séptica

2.2.9 Antibióticos utilizados en el cemento óseo

Fueron Buchholz y Engelbrecht los primeros en añadir un antibiótico al cemento óseo, concretamente gentamicina (31, 202). Los antibióticos eluyen de la superficie y los poros del cemento así como de las microgrietas. Las propiedades de elución de los antibióticos se han estudiado in vitro e in vivo. No todos los antibióticos pueden utilizarse con este fin y sólo unos pocos están disponibles de forma comercial. Cuando se necesita un antibiótico concreto que no está disponible en preparados comerciales, éste debe añadirse a mano durante la preparación del cemento siendo importante conseguir la homogeneidad de la mezcla. El exceso de antibiótico sin disolver se aglomera en agregados excediendo el tamaño crítico para PMMA. Sin embargo, dosis de 2 g de antibiótico en polvo bien distribuido pueden no tener consecuencias negativas sobre las propiedades mecánicas del cemento si el tamaño de las inclusiones está por debajo del tamaño crítico para el PMMA (118).

Los implantes artificiales son muy sensibles a la colonización bacteriana ya que las bacterias crean rápidamente un biofilm protector y entran en un estado latente,

disminuyendo su sensibilidad a los antibióticos y escapando al sistema inmunitario, lo que hace que el tratamiento local sea especialmente importante (84).

La elución de antibiótico del cemento óseo se caracteriza por presentar un pico inicial muy alto al principio, debiendo superar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB), que disminuye a un nivel menor que se mantiene durante un tiempo determinado, siendo esta curva típica para todos los cementos óseos. Las concentraciones bactericidas más elevadas que han sido medidas en hueso periprotésico se han alcanzado pocos días tras su implantación (104). Se ha observado que se produce una mínima liberación incluso pasados 5 años, lo que teóricamente no es positivo, ya que favorecería la aparición de resistencias (112).

Los antibióticos elegidos para ser añadidos al cemento óseo deben reunir una serie de características bacteriológicas, químicas y físicas que se reflejan en la Tabla 7 (28).

Propiedades de los antibióticos usados en el cemento óseo
1. Alta hidrosolubilidad
2. Resistencia al calor (estabilidad térmica)
3. No interacción química con los componentes del cemento (estabilidad química)
4. Bajo efecto sobre las propiedades mecánicas del cemento
5. Adecuada liberación desde el cemento
6. Amplio espectro antibacteriano, incluyendo Gram positivos y Gram negativos
7. Buen efecto bactericida a bajas concentraciones (excepto clindamicina)
8. Baja incidencia de gérmenes con resistencia primaria
9. Baja tasa de desarrollo de resistencias
10. Bajo potencial alérgico
11. Baja unión a proteínas

Tabla 7. Propiedades que deben cumplir los antibióticos para poder ser usados en el cemento óseo

La combinación más usada en EEUU es la tobramicina y vancomicina. En Europa lo habitual es usar cemento comercialmente cargado con gentamicina y clindamicina o usar cemento con gentamicina y añadirle vancomicina. El pico de elución de estos antibióticos ocurre entre las 3 y las 18 horas después su implantación, su combinación ha mostrado un efecto sinérgico aumentando la elución en un 68% y un 103% respectivamente (22). Otras combinaciones, como la vancomicina y tobramicina, y vancomicina y meropenem, también producen sinergia (13, 162).

Varios antibióticos con espectro antibiótico adecuado para las infecciones periprotésicas como la cefazolina, ciprofloxacino, linezolid, levofloxacino y rifampicina, se han probado de acuerdo a su capacidad de elución y actividad bactericida y se ha visto que son adecuados para su incorporación en PMMA (Tabla 8, en Anexo). Otros antimicrobianos no son aptos para ser añadidos en el cemento como es el caso de la anfotericina B, que no eluye del cemento óseo (82). Sin embargo, la adición de este antifúngico aumenta las propiedades mecánicas del cemento al formar enlaces covalentes en la matriz de PMMA. En el caso concreto de la rifampicina, inhibe la reacción de polimerización del cemento impidiendo su completo fraguado, por lo que no se usa en la práctica clínica a pesar de mostrar buena elución (8, 71).

Cualquier tratamiento antibiótico puede producir potencialmente resistencias (creándolas o seleccionando colonias previamente resistentes). En el caso de la gentamicina, tras muchos años de uso, se ha demostrado una alta sensibilidad de los gérmenes (172). No obstante, cada día se conoce más sobre gérmenes multirresistentes. La preocupación por las resistencias ha impulsado el estudio de otros antibióticos que puedan mezclarse con el cemento óseo para tratar las infecciones periprotésicas. Los cementos comerciales con gentamicina disponibles en Europa se muestran en la Tabla 9, en anexo. Existen únicamente dos sinergias con presentación comercial, la

combinación de clindamicina y gentamicina (Copal G+C®) y la combinación de vancomicina y gentamicina (Copal G+V®), esta última comercializada recientemente (58). A pesar de las normas que deben cumplir estos cementos, debido a diferencias en la composición y a los cambios que producen los diferentes procesos de esterilización, existen grandes diferencias en la liberación de gentamicina entre los distintos preparados comerciales (112, 114).

Los antibióticos se añaden en forma de polvo, lo que hace que sea imposible que difundan a través de un polímero duro y vítreo. El mecanismo de elución de los antibióticos está muy relacionado con las propiedades de absorción de agua del cemento en relación al tiempo y la distancia desde la superficie del cemento. La tasa de difusión de los antibióticos depende de varios factores, como la composición química del cemento, la superficie en la interfase cemento-hueso y la manipulación del cemento. Por ejemplo, el cemento Palacos® que contiene partículas esféricas pre-polimerizadas de P(MMA-co-MA) se ha visto que eluye la gentamicina más rápido que el Simplex® que contiene partículas de P(MMA-co-S). Además, el mezclado al vacío, que disminuye la porosidad del cemento, puede también disminuir la tasa de elución al 50% (162).

Los intentos por añadir gentamicina líquida, mucho más barata y disponible, han fracasado. A pesar de aumentar la elución de vancomicina un 146%, en esta forma líquida deteriora las propiedades mecánicas del cemento (99).

2.2.10 Utilidad de la rifampicina en la infección periprotésica

La rifampicina, en combinación con otros antibióticos, es considerado el antibiótico de elección para el tratamiento de la infección estafilocócica de prótesis articulares por su actividad bactericida frente a las bacterias en fase estacionaria, su actividad intracelular y su capacidad de difusión en el biofilm. Las bacterias del biofilm pueden ser hasta 1000 veces más resistentes a los antibióticos que esas mismas bacterias crecidas en medio líquido (mayor resistencia a mayor profundidad en el biofilm) (127, 185). La concentración mínima inhibitoria (CMI) de rifampicina para los microorganismos más sensibles (clamidias y estafilococos) está en el rango de 0.01-0.02 µg/ml, y para las micobacterias más sensibles 0.1-0.2 µg/ml. Su actividad permanece invariable entre pH de 5.5 y 8.0. Sus propiedades físicas se muestran en la Tabla 10.

La rifampicina inhibe la síntesis de ARN ribosómico y mensajero al bloquear la subunidad beta de la ARN polimerasa ADN-dependiente bacteriana, bloqueando la transcripción del ARN. No se une a las polimerasas de las células eucarióticas de tal manera que la síntesis del ARN humano no se afecta. Tiene actividad bactericida frente a microorganismos grampositivos (*S.aureus*), *Neisseria* spp., *Chlamydia* spp. y *Mycobacterium* spp. La rifampicina es bacteriostática o bactericida según las concentraciones que alcance en su lugar de acción y la susceptibilidad del microorganismo (64). De forma empírica se utiliza en periodos de 6 a 9 meses, aunque últimamente se han acortado a 3 meses para la artroplastia de cadera y 6 para la de rodilla, siendo bien tolerada en tratamientos prolongados (111, 211).

Forma	Sólido
Color	Rojo
Olor	Inodoro
Peso Molecular	823 g/mol
EM (absorbancia máxima, PBS, pH 7.38)	33.20 (237 nm); 32.10 (255 nm); 27.00 (334 nm); 15.40 (475 nm)
Valor pH	No aplicable
Punto de fusión	194 °C
Punto de ebullición	Indeterminado
Punto de inflamación	No aplicable
Solubilidad en agua	2.5 mg/ml (pH 7.3, 25°C)

Tabla 10. Propiedades físicas de la rifampicina (70). EM: absorbancia molar; PBS: tampón fosfato salino

Su uso en monoterapia no se recomienda ya que genera resistencias rápidamente. La combinación con fluoroquinolonas ha mostrado gran eficacia y buena tolerabilidad, en modelos animales y en la infección humana. Drancourt et al. (52) utilizó rifampicina oral y ofloxacino en el tratamiento de diferentes implantes ortopédicos infectados por *Staphylococcus*, obteniendo curaciones del 81% en cadera y 69% en rodilla.

Otros antibióticos con actividad demostrada en el tratamiento de las infecciones periprotésicas ven limitado su uso por su difícil tolerabilidad a largo plazo. Es el caso del linezolid que, aunque presenta una excelente biodisponibilidad oral y no es inductor ni metabolizado por el citocromo P450 (CYP), muestra mala tolerancia en tratamientos que exceden las 2 semanas. Su eficacia en infección aguda y crónica fue del 100 y 92.3% respectivamente retirando el implante y del 72.2 y 42.8% sin retirarlo (183).

La combinación de linezolid con rifampicina ha sido recientemente estudiada en un modelo animal demostrando una eficacia inicial similar frente a rifampicina sola, pero con la ventaja de que previene el desarrollo de resistencias a rifampicina (145).

Hasta el momento la rifampicina sólo se ha utilizado por vía sistémica en el tratamiento de las infecciones de prótesis articulares. Teóricamente, su uso de forma tópica en los tejidos periprotésicos incrementaría las posibilidades de tratar exitosamente la infección, sin embargo, la adición de rifampicina al polimetilmetacrilato retrasa la polimerización del cemento, impidiendo su uso como espaciador o en la fijación de implantes (138).

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

3.1 Justificación del estudio

El cemento óseo puede funcionar como vehículo para la liberación local de antibióticos permitiendo alcanzar concentraciones elevadas en el tejido periprotésico, sin la toxicidad y los efectos secundarios que implicaría su administración sistémica. La rifampicina es un antibiótico interesante desde el punto de vista de la infección protésica por ser muy eficaz frente a grampositivos. Hasta el momento no se ha conseguido producir un cemento óseo (PMMA) con rifampicina que polimerice en un tiempo razonable y que tenga unas propiedades mecánicas apropiadas para su uso en la práctica clínica. La rifampicina reacciona con el peróxido de benzoilo y/o con la DmpT convirtiéndose en rifampicina oxidada. De esta forma, los iniciadores no pueden reaccionar con el PMMA y se retrasa la reacción de polimerización.

La creación de un cemento con unas características mecánicas adecuadas que contenga y eluya rifampicina a dosis superiores a la concentración mínima bactericida para un determinado microorganismo, es un importante desafío y un importante progreso en el control de la infección protésica.

La microencapsulación es una técnica que permite aislar la rifampicina del cemento óseo durante la polimerización de éste, permitiendo su correcto fraguado. La cápsula, al ser hidrosoluble, absorbería el líquido del PMMA, liberando la rifampicina al cemento óseo. La rifampicina eluiría a continuación del cemento óseo al tejido periprotésico. La vehiculización de la rifampicina para su uso en cemento óseo es un camino original y novedoso que hasta el momento no se ha explorado.

3.2 Hipótesis de trabajo

Hemos planteado las siguientes hipótesis:

Hipótesis conceptual (H1):

La vehiculización de la rifampicina en microcápsulas permite que el cemento óseo polimerice en un tiempo adecuado y mantenga unas propiedades mecánicas aceptables para la fabricación de espaciadores de cemento, liberándose posteriormente y alcanzando niveles adecuados para el tratamiento de la infección periprotésica.

Hipótesis operativas (H0):

La rifampicina añadida al cemento óseo incluso dentro de microcápsulas inhibe la polimerización del mismo, no permitiendo alcanzar unas propiedades mecánicas aceptables para la fabricación de espaciadores de cemento.

La rifampicina dentro de microcápsulas no inhibe la polimerización del cemento óseo adquiriendo éste unas propiedades mecánicas que le hacen apto para su uso como espaciador en las infecciones periprotésicas, sin embargo el proceso de microencapsulación impide la elución de niveles adecuados de antibiótico.

3.3 Objetivos

Los objetivos de nuestro estudio son los siguientes:

1. La microencapsulación de las partículas de rifampicina
2. La introducción de dichas microcápsulas en el cemento óseo de uso habitual
3. El completo fraguado del cemento óseo en un tiempo razonable
4. La liberación de la rifampicina de las microcápsulas y del cemento óseo
5. La conservación de las propiedades antimicrobianas de la rifampicina liberada frente a *Staphylococcus aureus*

MATERIAL Y MÉTODO

4. MATERIAL Y MÉTODO

4.1 Cemento óseo

Para la realización de este estudio experimental se han fabricado probetas de cemento óseo al que se han añadido microcápsulas de diferentes materiales en cuyo interior se encuentra la rifampicina. El PMMA empleado fue el cemento óseo radiopaco de alta viscosidad CMW®1 (DePuy International Ltd., Blackpool, Reino Unido), un cemento comercial de uso ampliamente extendido en nuestro medio, así como internacionalmente. Se trata de un copolímero de alta viscosidad que contiene sulfato de bario como elemento radiopaco. Su esterilización se realiza por irradiación gamma. Ha sido empleado en más de un millón de casos desde 1958. Ha demostrado excelentes propiedades mecánicas y de elución en series y registros a largo plazo. Se ha publicado un 83% de supervivencia del vástago Charnley fijado con CMW®1 tras 20 años de seguimiento (161). Su composición según ficha técnica se muestra en la Tabla 11.

Polvo (40g)		Líquido (18.37ml)	
Polimetilmetacrilato	88.85%	Metilmetacrilato	98.22%
Peróxido de benzoilo	2.05%	N,N-Dimetil-p-toluidina	0.82%
Sulfato de bario	9.10%	Etanol	0.94%
		Acido ascórbico	0.02%
		Hidroquinona	0.002%

Tabla 11. Composición del cemento CMW®1 (DePuy International Ltd., Blackpool, Reino Unido)

4.2 Rifampicina

La rifampicina utilizada en este estudio experimental fue Rifaldin® 600 mg inyectable i.v. (Sanofi, Barcelona, España). El envase contiene un vial con polvo liofilizado y una ampolla de disolvente, que no se utilizó. Cada vial contiene 600 mg de rifampicina sódica (Figura 11). Los demás componentes son: sulfoxilato de formaldehído y de sodio e hidróxido sódico (0.5 mEq) (Figura 12).

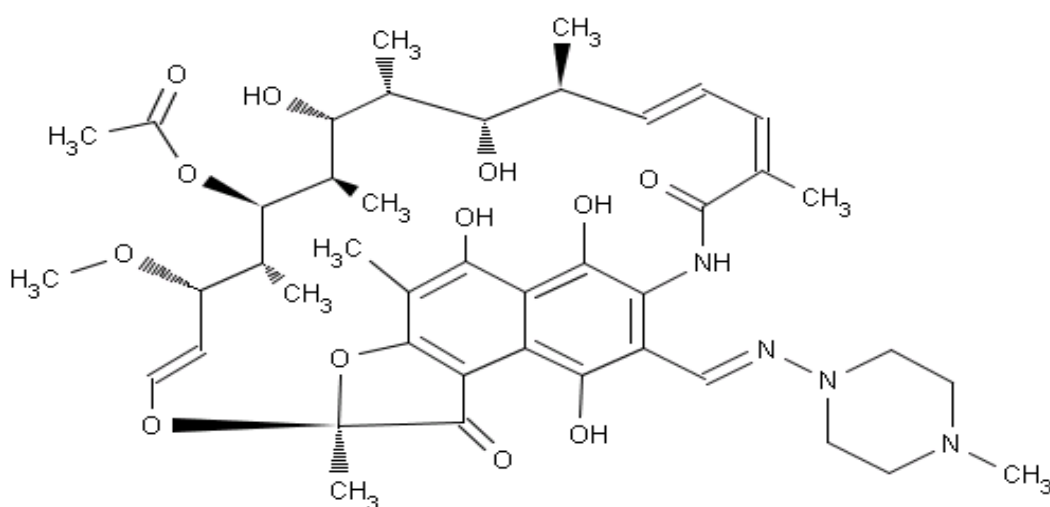


Figura 11. Esquema de la molécula de rifampicina



Figura 12. Rifaldin® 600 mg inyectable i.v.

4.3 Microencapsulación

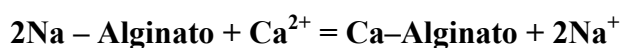
4.3.1 Síntesis y caracterización de las microcápsulas

La microencapsulación es el proceso de recubrimiento de medicamentos bajo la forma de partículas o glóbulos líquidos con materiales de distinta naturaleza para obtener partículas de tamaño micrométrico.

Las microcápsulas y micropartículas de rifampicina fueron sintetizadas por dos métodos, evaporación del disolvente y gelificación iónica, dependiendo de la naturaleza química del material de la cápsula (124). Se empleó alginato, polihidroxibutirato (PHBV), etilcelulosa y ácido esteárico para la fabricación de la cubierta de las microcápsulas. Las microcápsulas de PHBV, etilcelulosa y ácido esteárico fueron sintetizadas por el método de evaporación del disolvente mientras que las microcápsulas de alginato se fabricaron por gelificación iónica.

Gelificación iónica

La formación de la cubierta de las microcápsulas tiene lugar por una reacción entre un polisacárido y un ion de carga opuesta (100, 102, 207). Generalmente, se recurre a la gelificación de alginato sódico, un polianión, mezclado con cloruro cálcico, un catión. El método consiste en suspender el compuesto que se va a encapsular en una solución acuosa de alginato sódico, adicionando la mezcla, mediante goteo, sobre una solución acuosa de Cl_2Ca sometida a una velocidad de agitación adecuada. Al entrar en contacto la gota de alginato sódico con Ca^{2+} , se produce la gelificación instantánea de la misma, obteniéndose una membrana o cubierta de alginato cálcico que es insoluble en agua pero permeable. La reacción que tiene lugar es:



Evaporación del disolvente

El método de evaporación del disolvente consiste la formación de una emulsión. La fase interna de la emulsión es un polímero (en nuestro estudio PHBV, etilcelulosa o ácido esteárico) disuelto en un disolvente orgánico y con el principio activo. Posteriormente, la fase orgánica se dispersa en una solución acuosa que contiene el tensioactivo. Una vez formada la emulsión, se evapora el disolvente para conseguir la precipitación gradual del polímero a medida que se va eliminando el disolvente, dando lugar a las microesferas (7).

Todas las micropartículas obtenidas fueron analizadas con microscopía electrónica de barrido (SEM) (Philips X-30, Philips Electronic Instruments, NJ, EEUU). La morfología de las micropartículas fue esférica en las muestras de PHBV y etilcelulosa e irregular en las de ácido esteárico y alginato (Figura 13, A-D).

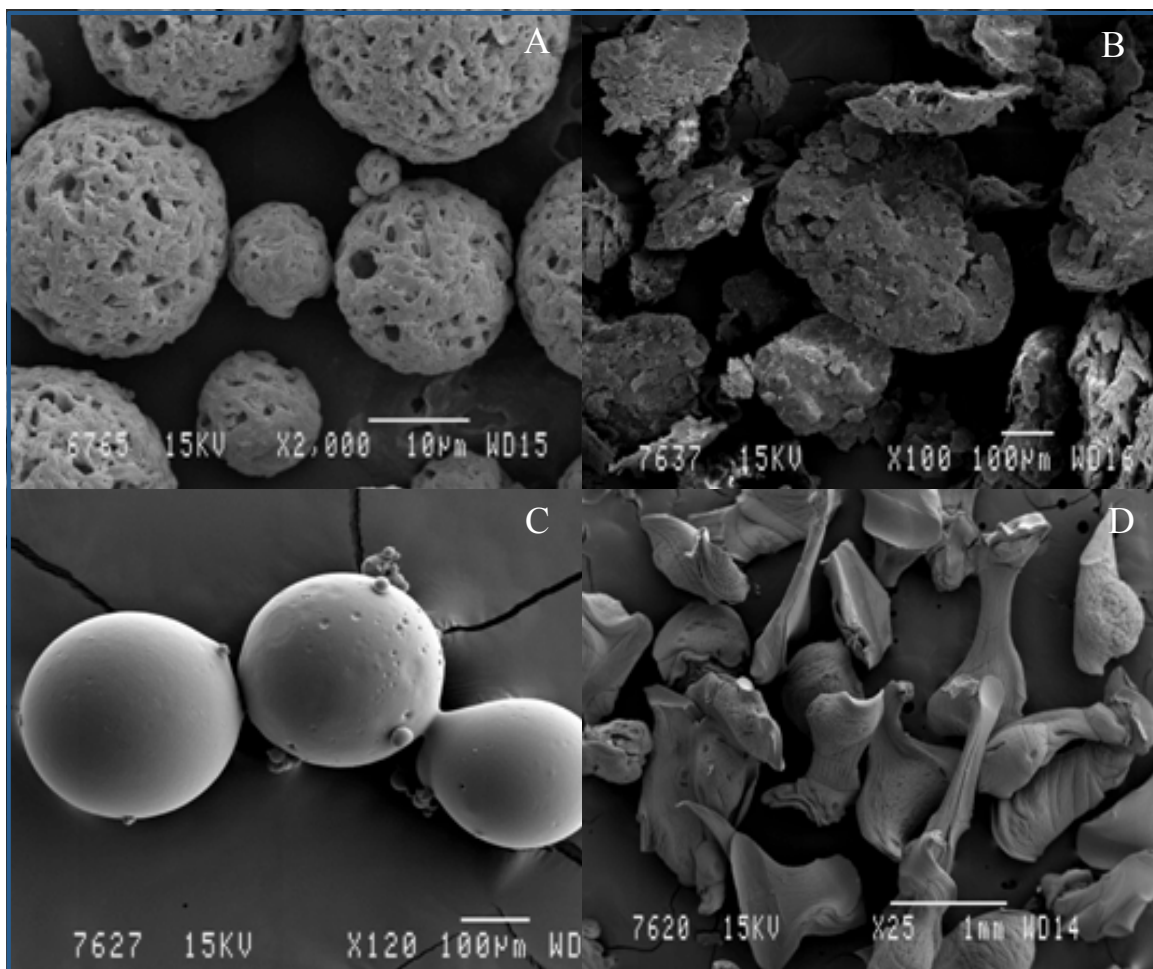


Figura 13. Microcápsulas de rifampicina; A: PHBV (polihidroxibutirato), B: ácido esteárico; C: etilcelulosa; D: alginato

4.3.2 Contenido de rifampicina en las microcápsulas

El contenido en principio activo o capacidad de encapsulación hace referencia a la cantidad de rifampicina encapsulada en las microcápsulas. Se calcula de la siguiente manera:

$$\% \text{ Rifampicina} = \text{Masa rifampicina} / \text{Masa microcápsulas} \times 100$$

Para determinar el contenido de rifampicina de las microcápsulas se disolvieron 5 mg de cada muestra en 5 ml de una disolución de diclorometano (10%) y metanol

(90%). Para favorecer la disolución total de la rifampicina, las microcápsulas con el disolvente se centrifugaron a 4000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se analizó mediante espectrofotometría ultravioleta visible (UV-Vis) previa construcción de la curva de calibrado correspondiente. Cada una de las muestras se analizó por triplicado. En el caso de las microcápsulas de alginato, el contenido de rifampicina se cuantificó mediante la disolución de las microcápsulas en ácido etilendiaminotetraacético (AEDT) 0.25 M ya que el alginato no se disuelve en diclorometano y metanol.

4.3.3 Rendimiento de producción de microcápsulas

El rendimiento de producción refleja el porcentaje de microcápsulas obtenidas en relación a la cantidad total de material (principio activo + polímero) empleado (124). Se definió de la siguiente manera:

$$\eta_{\text{MIC}} = \text{Masa microcápsulas obtenidas} / \text{Masa total de reactivos} \times 100$$

4.3.4 Rendimiento de microencapsulación de rifampicina

Se estudió el porcentaje de rifampicina contenido en las microcápsulas, que fue definido como el cociente entre la rifampicina total encapsulada y la rifampicina de partida, multiplicado por 100.

$$\eta_{\text{RIF}} = \text{Masa rifampicina en microcápsulas} / \text{Masa rifampicina inicial} \times 100$$

4.3.5 Elución de rifampicina de las microcápsulas en PBS

La elución se hizo en tampón fosfato salino (PBS). Se sumergieron 5 mg de cada muestra de microcápsulas en 5 ml de PBS y se incubaron las suspensiones a 37°C en un horno, extrayéndose alícuotas de 1 ml a los siguientes intervalos de tiempo: 6, 24 y 48 horas y 1, 2 y 5 semanas. El mililitro extraído cada vez se volvió a reponer con PBS y se tuvo en cuenta en la realización de los cálculos.

Previamente a la toma de la alícuota, la mezcla se homogenizó y se dejó reposar hasta que las microcápsulas sedimentaron, de forma que fuese posible tomar la alícuota sin retirar microcápsulas. Cada muestra se analizó por triplicado.

4.3.6 Elución de rifampicina del cemento óseo cargado con microcápsulas en PBS

La elución se hizo de forma similar a la elución de rifampicina directamente de las microcápsulas en PBS. Se introdujeron las probetas fabricadas con cemento óseo cargado de micropartículas en 5 ml de PBS y se incubaron a 37°C, extrayéndose alícuotas de 1 ml a las 6, 24, 48 horas y 1 y 2 semanas. El mililitro extraído se repuso con PBS y se tuvo en cuenta para la realización de los cálculos.

4.4 Definición de los grupos de estudio

Se prepararon diferentes muestras para los estudios mecánicos (ensayos de flexión, compresión, dureza y tiempo de fraguado) y para los estudios de elución y microbiológicos.

En los ensayos mecánicos el grupo control lo formaron las muestras realizadas a partir del cemento CMW®1 (DePuy International Ltd., Blackpool, Reino Unido). Se incluyeron otros tres grupos de estudio, definidos en función de la mezcla del cemento con diferentes tipos de microcápsulas conteniendo la rifampicina o bien, con rifampicina sin encapsular.

Para la determinación de la elución de rifampicina del cemento óseo se definieron los siguientes grupos de estudio: el grupo control lo formaron las muestras de cemento con rifampicina sin encapsular y los grupos de estudio las muestras de cemento con microcápsulas de alginato y las muestras de cemento con microcápsulas de poli-hidroxibutirato-hidroxivalerato (PHBV). Se eligieron estos dos porque fueron los que mejores rendimientos mostraron en los ensayos de elución de micropartículas en PBS. Las microcápsulas de ácido esteárico mostraron valores no reproducibles y las de etilcelulosa baja capacidad de elución por lo que se desecharon para posteriores ensayos (Figura 14). Se realizaron los ensayos de elución con tres lotes de fabricación de cada una de las muestras de cemento con microcápsulas con el fin de demostrar reproducibilidad.

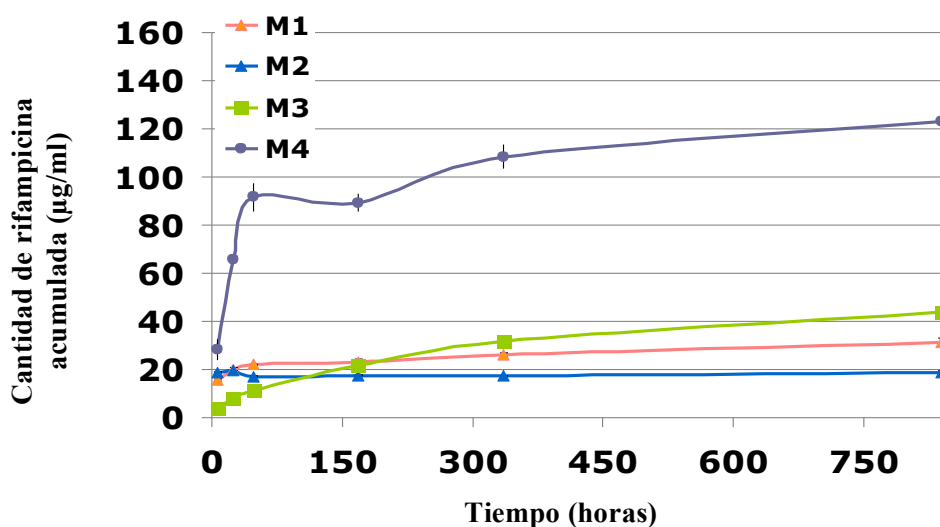


Figura 14. Elución de rifampicina en función del tiempo para las muestras de microcápsulas de etilcelulosa (M1), ácido esteárico (M2), PHBV (M3) y alginato (M4)

Para los estudios microbiológicos se definió un grupo control de cemento con rifampicina sin encapsular y dos grupos de estudio, uno con cemento con microcápsulas de alginato y otro con microcápsulas de PHBV, analizándose 2 o 3 lotes por cada grupo.

Los grupos de estudio quedaron definidos de la siguiente manera:

a) Ensayos mecánicos

Grupo 1 (Control): Cemento CMW®1

Grupo 2: Cemento CMW®1 + rifampicina sin encapsular

Grupo 3: Cemento CMW®1 + microcápsulas de poli-hidroxibutirato-hidroxivalerato (PHBV)

Grupo 4: Cemento CMW®1 + microcápsulas de alginato

b) Ensayos de elución y ensayos microbiológicos

Grupo 1 (Control): Cemento CMW®1 + rifampicina (sin encapsular)

Grupo 2: Cemento CMW®1 + microcápsulas de alginato

Grupo 3: Cemento CMW®1 + microcápsulas de poli-hidroxibutirato-hidroxivalerato (PHBV)

4.5 Preparación de las muestras

4.5.1 Preparación del cemento con rifampicina

La temperatura ambiente en el momento de realizar la mezcla fue de $23\pm 2^{\circ}\text{C}$, y la humedad relativa del $55\pm 10\%$. Los componentes no se enfriaron previamente. La mezcla se preparó de forma manual en una batea, siguiendo las instrucciones del fabricante durante el proceso de mezclado, siguiendo la norma ASTM F451:99 (“Standard specification for acrylic bone cement”) (133) y el estándar internacional ISO 5833:2002 (“Implant for surgery-acrylic resin cements”) (137, 152).

Se mezcló el polvo de polímero con el monómero en la batea, removiendo con una espátula en sentido horario mediante giros de frecuencia homogénea. Cuando había que añadir rifampicina sin encapsular o bien microcápsulas de rifampicina, el proceso de mezclado se realizó como se indica en la Tabla 12.

Una vez alcanzada la fase pastosa, se dejó reposar hasta comprobar que la mezcla no se adhería (aproximadamente 2 minutos a temperatura de trabajo según especificaciones del fabricante), iniciando a continuación la manipulación para la preparación de las muestras.

Equipamiento	Procedimiento	
Contenedor apropiado Espátula (ambos estériles)	1° Paso	Pasar el contenido en polvo al contenedor
	2° Paso	Añadir la misma cantidad de cemento en polvo que de antibiótico
	3° Paso	Mezclar ambas cantidades homogéneamente
	4° Paso	Añadir la misma cantidad de polvo a la mezcla que la cantidad obtenida
	5° Paso	Mezclar ambas cantidades homogéneamente
	6° Paso	Repetir pasos 4° y 5° hasta terminar con el PMMA en polvo
	7° Paso	Añadir el MMA líquido y proceder al mezclado según las recomendaciones del fabricante

Tabla 12. Método para la adición manual del antibiótico según Frommelt (68)

4.5.2 Preparación de las muestras para los ensayos de elución en PBS

Se prepararon muestras de cemento óseo conteniendo 5% P/P (porcentaje en peso) de las microcápsulas con cubierta de PHBV y alginato, así como 1.25% P/P de rifampicina sin encapsular. La relación fue:

- 40 gramos de cemento con 0.5 g de rifampicina sin encapsular
- 40 gramos de cemento con 2 g de microcápsulas de PHBV o alginato

Se fabricaron cilindros de cemento óseo de 6 mm de diámetro y 12 mm de altura con moldes prediseñados de PTFE (Teflón®) (Figuras 15-17). Tras introducir en los orificios el cemento en fase pastosa y retirar el sobrante, se colocaron las tapas superior e inferior.

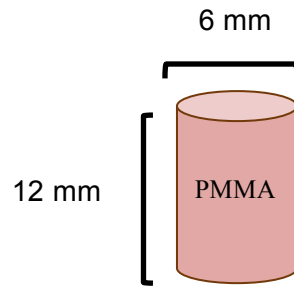


Figura 15. Esquema de la forma y dimensiones de las muestras para ensayos de elución en PBS



Figura 16. Molde utilizado para fabricar las muestras de cemento para los ensayos de elución



Figura 17. Molde sometido a presurización con una mordaza

Para los ensayos de elución en PBS, se dejaron fraguar al menos 24 horas, se pesaron y se introdujeron en tubos cerrados con 5 ml de PBS (Figura 18). A continuación se introdujeron en la estufa a 37°C en ausencia de luz. Cada intervalo de tiempo en que se realizaron las mediciones (6, 24, 48 horas y 1 semana) se sacaron los cilindros de los tubos y se introdujeron otros con PBS nuevo. La cantidad de rifampicina en la solución de PBS anterior se determinó mediante UV-Vis, realizando al menos dos medidas de dicha solución.

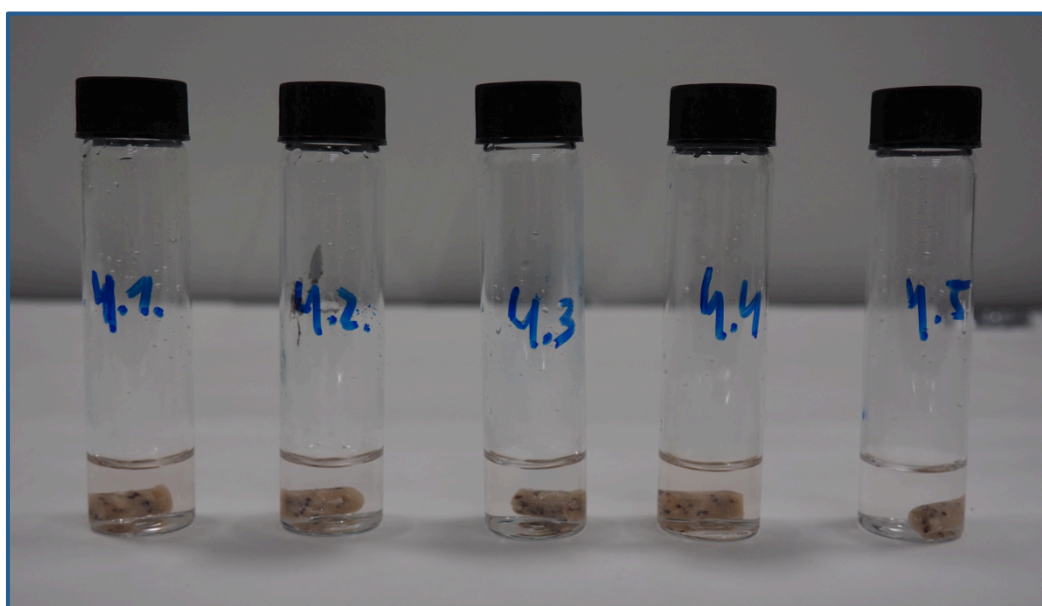


Figura 18. Tubos de ensayo con 5 ml de PBS y muestra de cemento con microcápsulas

4.5.3 Preparación de las muestras para los ensayos de flexión

Se utilizó un molde prediseñado de silicona para obtener muestras rectangulares de 80.0 ± 0.1 mm de longitud, 10.0 ± 0.1 mm de anchura y 4.0 ± 0.1 mm de espesor (Figuras 19 y 20) según el estándar internacional ISO 5833:2002.



Figura 19. Molde de silicona utilizado para fabricar las muestras para el estudio de resistencia a la flexión

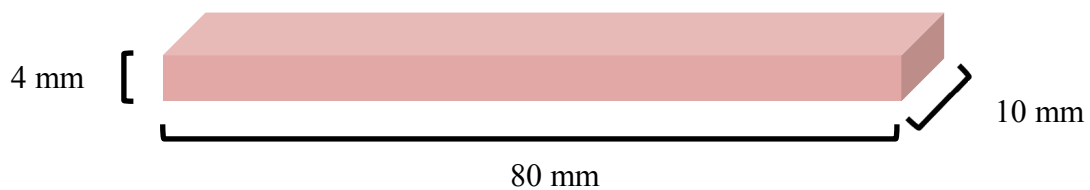


Figura 20. Esquema del tamaño y forma de las muestras para el estudio de resistencia a la flexión

Una vez extraídas del molde, las muestras se prepararon con una lija manualmente para eliminar las posibles irregularidades macroscópicas y conseguir su homogeneidad. Mediante este procedimiento se obtuvieron entre 3 y 5 muestras por cada grupo de estudio (cemento solo, cemento con microcápsulas de alginato, cemento con microcápsulas de PHBV y cemento con rifampicina sin encapsular). Se descartaron aquellas probetas que presentaban burbujas macroscópicas antes del ensayo o aquellas que se rompieron por una burbuja.

Se ensayaron cuatro puntos pasada una semana de su fabricación, a una velocidad de ensayo de 5 mm/min y con una célula (carga de ensayo) de 5 kN.

4.5.4 Preparación de las muestras para los ensayos de compresión

Se siguieron los estándares internacionales ISO 5833:2002 para la realización de los ensayos de compresión. Se fabricaron probetas cilíndricas de 12.0 ± 0.1 mm de altura y 6.0 ± 0.1 mm de diámetro (Figura 21). Se fabricaron entre 4 y 6 probetas de cemento por lote, fabricándose 3 lotes por cada tipo de microcápsula. Pasada una semana tras su fabricación se ensayaron, a una velocidad de compresión de 20 mm/min y con una célula de 20kN.

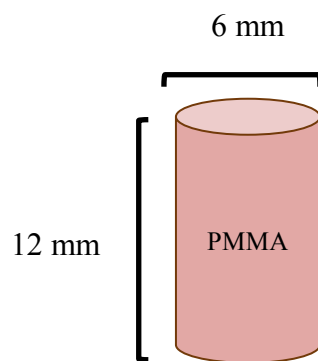


Figura 21. Esquema del tamaño y forma de las muestras para el estudio de compresión

4.5.5 Preparación de las muestras para los ensayos de tiempo de fraguado (dureza)

Se realizaron en función del estándar internacional UNE-ISO 7619-1:2011 (Caucho vulcanizado o termoplástico. Determinación de la dureza de indentación) (153). Se fabricaron probetas idénticas a las de los ensayos de flexión.

Se comprobó el estado de fraguado cada 15 minutos durante la primera hora, a las 2h, 3h, 4h y 24h tras la fabricación del cemento mediante ensayos de dureza. Se tomaron 3 medidas para cada uno de los tiempos y grupos.

Se realizaron ensayos de flexión pasados los primeros 45 minutos de fraguado para los cuatro casos (cemento sin antibiótico, cemento con rifampicina sin encapsular, cemento con microcápsulas de PHBV y cemento con microcápsulas de alginato), preparándose entre 3 y 4 muestras de cada tipo de cemento, realizando 5 medidas en cada muestra. Se ensayaron a una velocidad de ensayo de 5 mm/min y con una célula de 5 kN.

4.5.6 Preparación de las muestras para los ensayos microbiológicos

Se fabricaron probetas de cemento óseo de 2 mm de espesor y 12 mm de diámetro con moldes metálicos prediseñados (Figuras 22 y 23). Tras introducir el cemento en fase pastosa y retirar el sobrante, se colocaron las tapas superior e inferior.

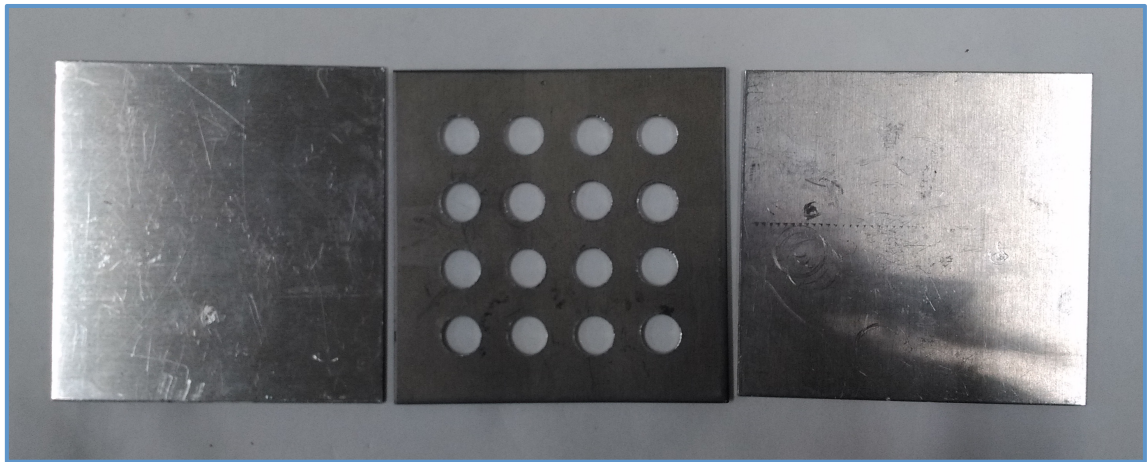


Figura 22. Molde utilizado para fabricar las muestras para los estudios microbiológicos

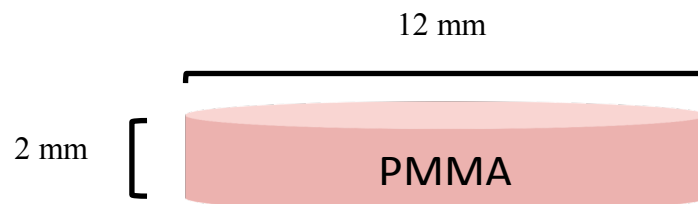


Figura 23. Esquema del tamaño y forma de las muestras para los estudios microbiológicos

4.6 Equipos y materiales utilizados en los ensayos

4.6.1 Ensayos de elución

Se utilizó el Sistema de Espectroscopía UV-Visible Agilent 8453® (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) (Figura 24) seleccionando una longitud de onda (λ) de 334nm, que es el pico de absorbancia más estable de la rifampicina, utilizando rectas de calibrado calculadas previamente. El espectro UV-Vis de la rifampicina se muestra en la Figura 25.



Figura 24. Espectrofotómetro para medir la cantidad de rifampicina en el PBS

La absorbancia (A) está relacionada linealmente con la concentración de la especie absorbente según la Ley de Beer-Lambert:

$$A = \epsilon \cdot l \cdot c$$

(ϵ : coeficiente de absortividad molar, l : camino óptico, c : concentración de la especie absorbente) (30).

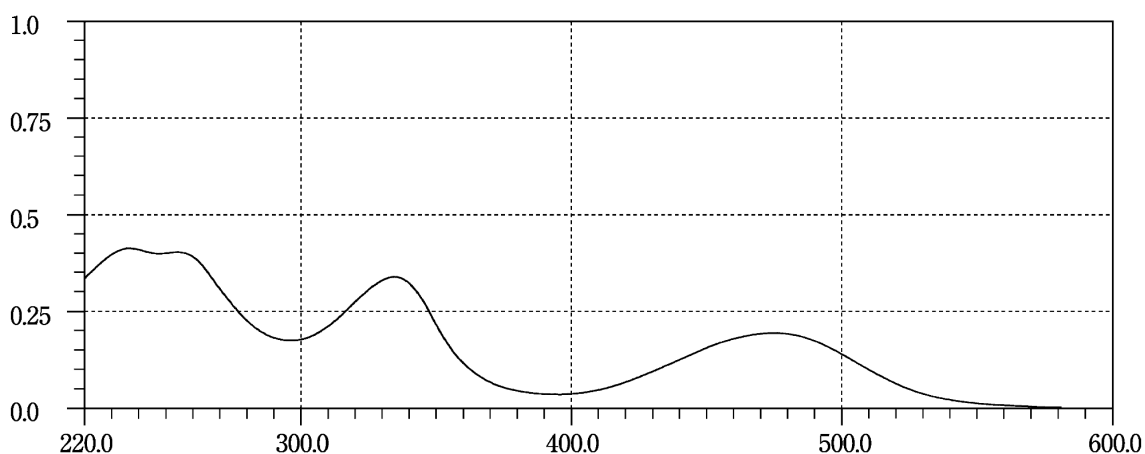


Figura 25. Espectro UV-Vis de la rifampicina

El espectrofotómetro está conectado a un ordenador con el software Agilent ChemStation® que muestra los resultados de absorbancia. La fuente de radiación consiste en una combinación de una lámpara de descarga de deuterio para el rango de longitudes de onda de UV (ultravioleta) y una lámpara de wolframio para el rango de longitudes de onda visible y de SWNIR (onda corta del infrarrojo cercano). La imagen del filamento de la lámpara de wolframio se enfoca en la abertura de descarga de la lámpara de deuterio. La lente de la fuente forma un único haz luminoso colimado. El haz pasa a través del área del obturador/filtro de corrección de dispersión luminosa y a continuación a través de la muestra hasta la lente y la rendija del espectrógrafo. En el espectrógrafo, la luz se dispersa sobre una matriz de diodos mediante una red de difracción holográfica.

Se trata de un espectrofotómetro de doble haz, que cuenta con dos compartimentos para celdas de muestra permitiéndole medir simultáneamente la cantidad de energía radiante absorbida por una matriz (blanco) y la energía absorbida por la muestra compuesta por la matriz y la especie de interés (Figura 26). Se usaron celdas de muestra de cuarzo, ya que permiten utilizar el rango completo de longitudes de onda del espectrofotómetro. Ambas celdas de muestra se enjuagaron 4-5 veces con PBS antes de llenarlas con PBS solo o con la especie de interés. La cantidad de rifampicina en el PBS se indica en el interface del software del ordenador en forma de absorbancia (A) y concentración ($\mu\text{g/ml}$).

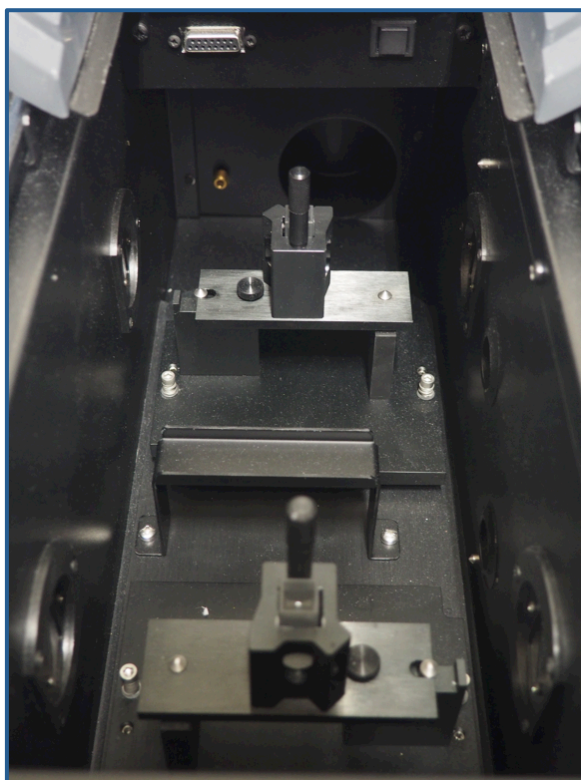


Figura 26. Detalle del espectrofotómetro donde se muestran los dos compartimentos para introducir la muestra blanco y la muestra de interés

4.6.2 Ensayos de compresión

Cada probeta fue ensayada hasta fallo utilizando una Máquina de Ensayos Universales ELIB 20W (Ibertest, Madrid, Spain). La tensión de rotura a compresión se calculó conforme lo especificado en la normativa de cementos óseos ISO 5833:2002 (Figura 27).



Figura 27. Máquina de Ensayos Universales ELIB 20W (Ibertest, Madrid, Spain)

4.6.3 Ensayos de flexión

Se utilizó una máquina de ensayos universales BTH/500 (Ibertest group, Madrid, España) (Figura 28). Es una máquina de ensayos de alta precisión para cargas de ensayo de hasta 5 kN. Se realizaron ensayos de flexión en cuatro puntos. Cada una de las probetas se ensayó hasta fallo. Se registró durante cada ensayo la fuerza frente al desplazamiento para posteriormente determinar la tensión de rotura de cada una de las probetas conforme se especifica en la norma ISO 5833:2002 (Figura 29).



Figura 28. Máquina de ensayos universal BTH/500 (Ibertest group, Madrid, España)

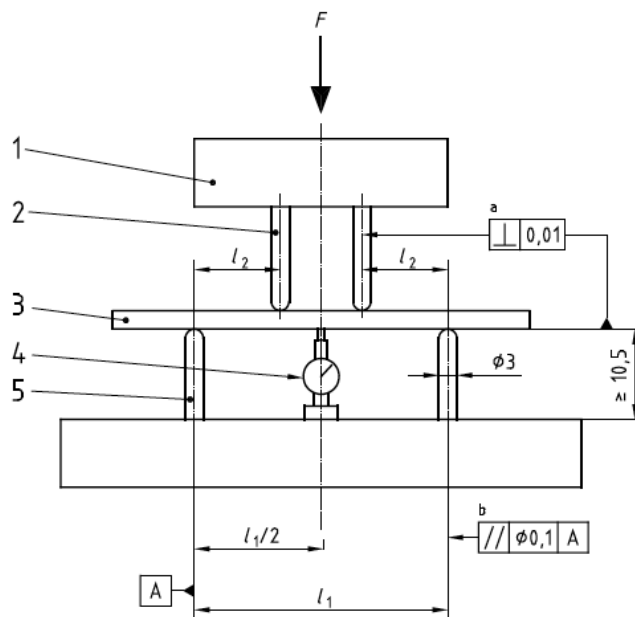


Figura 29. Esquema de aplicación de la fuerza para el ensayo de flexión en 4 puntos

4.6.4 Ensayos de dureza

Se utilizó el durómetro Shore (BAREISS, Neurtek, Eibar, España) (Figura 30) con un penetrador tipo D utilizando una carga de 50N. La dureza es la resistencia de un material ante la penetración de un cuerpo más duro. Se utilizó el procedimiento “dureza Shore”, el cual mide la reacción elástica del material cuando dejamos caer sobre él o intentamos penetrarlo con un material más duro. El indentador se somete a una carga a través de un muelle con unas características predefinidas. Cuanto más grande es la dureza del material a ensayar, menor la profundidad de penetración y mayor la carga aplicada. La energía que no se absorbe en el choque se traduce en un rebote, que es lo que se mide en el ensayo. Se utilizó la escala D (para elastómeros termoplásticos), que usa un cono de $30\pm 1^\circ$ de angulación y una carga de 49.05N.



Figura 30. Durómetro BAREISS

4.6.5 Ensayos microbiológicos

Se emplearon 8 placas de Petri con agar sangre que fueron previamente inoculadas con *Staphylococcus aureus* subespecie aureus ATCC® 29213™ (Manassas, USA) para determinar la actividad antimicrobiana de las muestras de cemento.

En el laboratorio de microbiología, se tomó una muestra del microorganismo y se diluyó en agua estéril en un tubo de ensayo hasta alcanzar concentración de 0.5 de Mac Farland utilizando un turbidímetro (Microscan®, Baxter, West Sacramento, CA, USA) (Figura 31). A continuación, con un asa bacteriológica se sembraron las placas de Petri uniformemente, en tres direcciones con giros de 60°. En dos placas se colocaron muestras de cemento con rifampicina sin encapsular, en tres placas muestras de cemento con microcápsulas de alginato (correspondientes a 3 lotes diferentes de microcápsulas) y en otras tres, muestras de cemento con microcápsulas de PHBV (correspondientes a 3 lotes diferentes de microcápsulas).



Figura 31. Turbidímetro utilizado para preparar muestra de *S.aureus*

Cada muestra de cemento se colocó en el centro de una placa de Petri utilizando pinzas estériles (Figura 32). Se sometió a incubación en estufa a 37°C durante 24 horas. Se determinó el radio del halo de inhibición en mm a las 24 horas de incubación con una regla calibrada, desde donde terminaba la muestra de cemento hasta donde se inhibió el crecimiento de *S.aureus*, y a partir del radio se calculó el diámetro del halo de inhibición. Para reducir la variabilidad de la medición, tres observadores independientes realizaron las mediciones. Este sistema se basa en el método de difusión en disco (Baeur-Kirby) el cual prueba la inhibición o la resistencia de los microorganismos enfrentándolos al antibiótico en cuestión. Atendiendo al halo de inhibición se clasifican los microorganismos como sensibles (S), intermedios (I) o resistentes (R) (11, 14). En nuestro estudio, la presencia del halo de inhibición nos indicó que la rifampicina microencapsulada era capaz de eluir de las microcápsulas y del cemento óseo, difundir en el medio de agar sangre e inhibir el crecimiento de *S.aureus*.

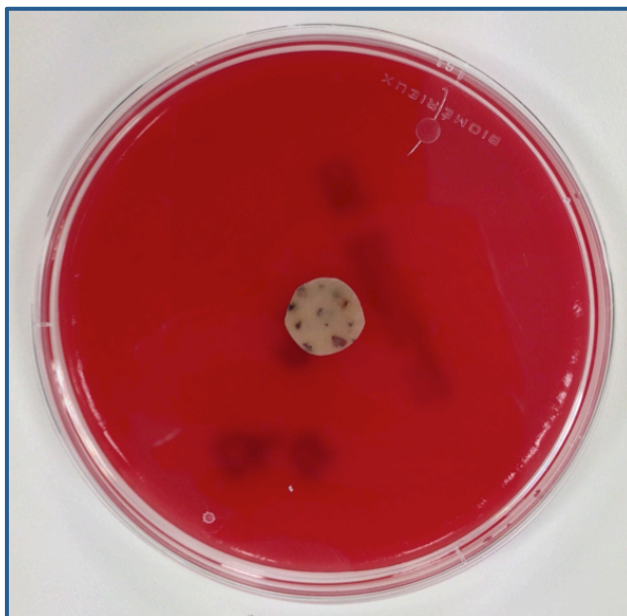


Figura 32. Placa de Petri con agar sangre inoculadas con *S.aureus* y muestra de cemento, antes de la incubación

4.7 Control de calidad

Los equipos utilizados en este estudio experimental fueron calibrados y controlados antes de su uso con el fin de que los resultados obtenidos fueran reproducibles al repetir los ensayos en las mismas condiciones. Los datos obtenidos fueron supervisados por dos ingenieros industriales (Departamento de Ingeniería Mecánica, Universidad Pontificia Comillas, Madrid) independientes al estudio.

Los métodos de estudio usados están bien establecidos y las posibles modificaciones se han realizado siguiendo las diferentes normas internacionales de la American Society for Testing and Material (ASTM), la International Organization for Standardization (ISO) y AENOR (UNE).

4.8 Análisis de los datos

4.8.1 Variables de medición

Ensayos de elución

Se determinó la absorbancia (A) para una longitud de onda 334 nm y la concentración de rifampicina eluida (CC µg/ml) que se relacionan de forma lineal según la fórmula:

$$A = \epsilon \cdot l \cdot CC$$

ϵ : coeficiente de absortividad molar

l: camino óptico

CC: concentración de la especie absorbente (rifampicina) (µg/ml)

Estas mediciones se realizaron directamente de las microcápsulas en PBS y con probetas de cemento conteniendo los diferentes tipos de microcápsulas y la rifampicina sin encapsular en PBS.

Ensayos de compresión y flexión

Se midió la resistencia a la compresión y a la flexión respectivamente (MPa). En los ensayos de flexión además se midieron la fuerza máxima (N) y el módulo de elasticidad (MPa). Estas mediciones se realizaron para el cemento control, cemento con rifampicina sin encapsular, cemento con microcápsulas de alginato y PHBV.

La relación entre la resistencia y la fuerza máxima se define por la siguiente fórmula:

$$B = 3Fa / bh^2$$

B: Resistencia a la tensión (Megapascuales)

F: fuerza (Newtons)

a: distancia entre los puntos de carga internos y externos (20mm)

b: anchura media de la probeta (mm)

h: espesor medio de la probeta (mm)

Ensayos de dureza

Se midió la dureza en unidades de dureza Shore utilizando la escala D (H_D). Se midió también el tiempo de fraguado (minutos).

Ensayos microbiológicos

Se midieron los halos de inhibición (mm) desde donde terminaba la muestra de cemento hasta donde se inhibió el crecimiento de *S.aureus*. A partir de este radio se calculó el diámetro del halo de inhibición.

4.8.2 Estadística

El análisis estadístico se realizó con el paquete informático SPSS versión 22.0 para Mac OS (SPSS Inc. Chicago USA). Se definió como una diferencia estadísticamente significativa aquella cuyo valor de p estuviera por debajo del 5% ($p < 0.05$). Se usó el test de ANOVA para medidas repetidas para estudiar las diferencias entre las medias de las diferentes variables de cada ensayo. Para determinar qué medias en las variables diferían se realizó un análisis post hoc según el método de Bonferroni, ajustado para la realización de comparaciones múltiples.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 Ensayos de encapsulación

5.1.1 Rendimiento de la producción de microcápsulas

Las muestras iniciales quedaron definidas como se refleja en la Tabla 13.

Muestra	Polímero de la cubierta	Composición	Rendimiento
M1	PHBV	PHBV: 0.95g Rif: 0.12g Masa obtenida: 0.639g	59.7%
M2	PHBV	PHBV: 0.93g Rif: 0.12g Masa obtenida: 0.75g	71.6%
M3	Ácido esteárico	Ác esteárico: 0.90g Rif: 0.12g Masa obtenida: 0.71g	69.5%
M4	Ácido esteárico	Ác esteárico: 0.93g Rif: 0.12g Masa obtenida: 0.80g	76%
M5	Etilcelulosa	Etilcelulosa: 0.92g Rif: 0.12g Masa obtenida: 0.93g	89.4%
M6	Alginato	Alginato: 1.5 g Rif: 0.2 g Relación RIF/Alginato: 0.13	-

Tabla 13. Polímero de cubierta, composición y rendimiento de producción de las diferentes muestras de microcápsulas

Las muestras M1 y M2, así como las muestras M3 y M4, son dos productos obtenidos en las mismas condiciones pero en dos síntesis diferentes. Respecto a la

muestra M6 (alginato), no se calculó el rendimiento de la producción de microcápsulas inicialmente dado que no se disponía de la información sobre la masa obtenida.

5.1.2 Contenido de rifampicina en las microcápsulas

Los valores de concentración de rifampicina, medidos por triplicado para cada muestra, se reflejan en la Tabla 14, en Anexo. La microencapsulación con etilcelulosa (M5) mostró mayor contenido de rifampicina que el resto (69.9 $\mu\text{g/ml}$). Las muestras de PHBV mostraron concentraciones de 24.9 y 23.5 $\mu\text{g/ml}$, y la de alginato 9.7 $\mu\text{g/ml}$. Posteriormente se observó que al emplear AEDT para disolver las microcápsulas de alginato en vez de metanol y diclorometano, la liberación de rifampicina era mayor. Las muestras de ácido esteárico mostraron valores no reproducibles. Las diferencias entre todas las muestras (excepto las de PHBV entre sí) alcanzaron la significación estadística (Tabla 15, en Anexo). Las muestras de PHBV (M1 y M2) no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de rifampicina ($p=1$).

Los valores medios de las concentraciones de rifampicina de las diferentes microcápsulas estudiadas, así como la desviación estándar y el error estándar se muestran en la Tabla 16.

Muestra	Concentración media (µg/ml)	Desviación estándar	Error estándar	% RIF
M1	24.90	2.088	1.21	2.49
M2	23.50	0.79	0.46	2.35
M3	3.10	0.00	0.00	0.31
M4	16.33	1.51	0.87	1.63
M5	69.87	2.18	1.26	6.98
M6	9.73	1.56	0.89	5.5

Tabla 16. Medias, desviación estándar y error estándar de las concentraciones de rifampicina de las diferentes microcápsulas estudiadas (M1 y M2: PHBV, M3 y M4: ácido esteárico, M5: etilcelulosa y M6: alginato)

5.1.3 Rendimiento de microencapsulación de rifampicina

El rendimiento de la encapsulación de la rifampicina en las diferentes muestras se indica en la Tabla 17.

El mayor rendimiento de encapsulación se observó con la muestra de etilcelulosa (54.17%), seguido de las microcápsulas de PHBV (13.26 y 14.45%). No se pudo calcular el rendimiento de microencapsulación de alginato, al igual que ocurrió con el rendimiento de producción de microcápsulas, por no disponer de datos sobre la masa obtenida.

Muestra	Polímero de la cubierta	RIF total encapsulada	Rendimiento encapsulación (%)
M1	PHBV	0.0159	13.26
M2	PHBV	0.0176	14.45
M3	Ácido esteárico	0.0022	1.84
M4	Ácido esteárico	0.0131	10.62
M5	Etilcelulosa	0.0650	54.17
M6	Alginato	-	-

Tabla 17. Rendimiento de encapsulación de rifampicina en las diferentes microcápsulas estudiadas (M1 y M2: PHBV, M3 y M4: ácido esteárico, M5: etilcelulosa y M6: alginato)

5.2 Ensayos de elución en PBS

5.2.1 Elución de las microcápsulas en PBS

En los ensayos de elución de las distintas microcápsulas se observó diferente comportamiento de elución en función del polímero empleado en fabricar la cubierta de las microcápsulas (Figura 33).

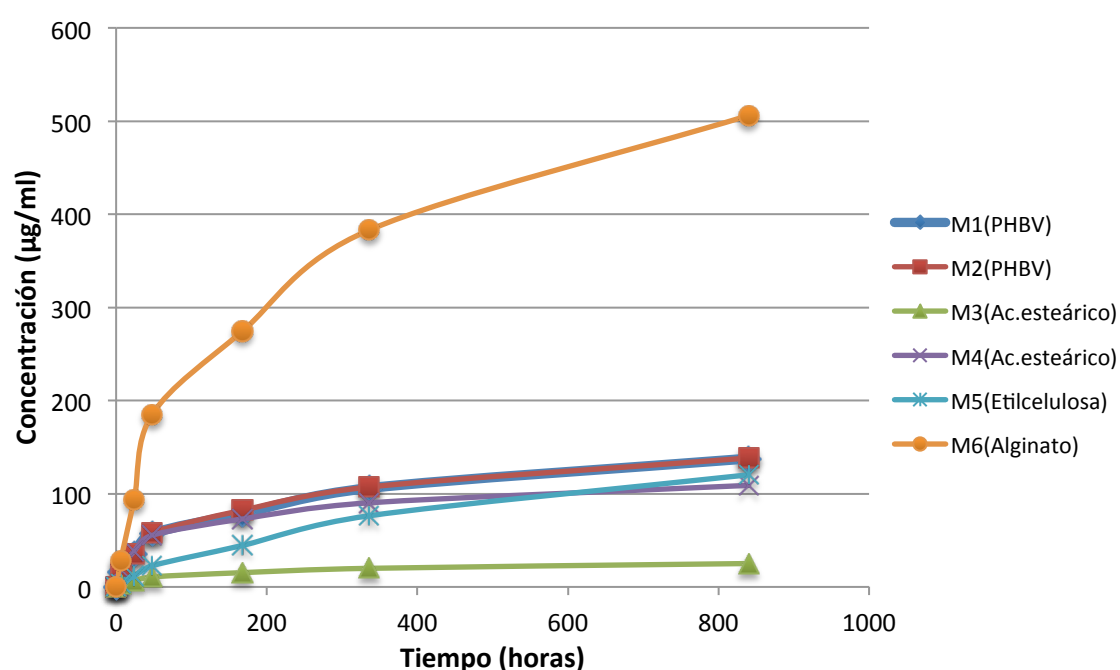


Figura 33. Elución de rifampicina en PBS en cada muestra en los diferentes tiempos de medida (valores medios)

Se calcularon la media y el error estándar de la concentración de rifampicina eluída por cada grupo de muestras en los diferentes momentos de medición (Tabla 18). Los datos completos se muestran en la Tabla 19, en Anexo.

Muestra	Tiempo	Concentración media (µg/ml)	Error estándar
M1(PHBV)	6h	15.93	1.03
	24h	19.40	0.59
	48h	21.77	1.56
	1s	21.77	1.02
	2s	27.23	1.43
	5s	31.72	3.26
M2(PHBV)	6h	15.23	1.03
	24h	20.20	0.59
	48h	22.33	1.56
	1s	24.57	1.02
	2s	24.93	1.43
	5s	31.13	3.26
M3(Ac.esteárico)	6h	3.27	1.03
	24h	3.60	0.59
	48h	3.93	1.56
	1s	4.53	1.02
	2s	4.63	1.43
	5s	5.13	3.26
M4(Ac.esteárico)	6h	18.83	1.03
	24h	19.57	0.59
	48h	17.13	1.56
	1s	17.50	1.02
	2s	17.27	1.43
	5s	18.73	3.26
M5(Etilcelulosa)	6h	3.70	1.03
	24h	7.93	0.59
	48h	11.17	1.56
	1s	21.77	1.02
	2s	31.83	1.43
	5s	43.97	3.26
M6(Alginato)	6h	28.27	1.03
	24h	65.50	0.59
	48h	91.63	1.56
	1s	89.30	1.02
	2s	108.40	1.43
	5s	122.97	3.26

Tabla 18. Concentraciones medias ($\mu\text{g/ml}$) y error estándar de la rifampicina eluida por las diferentes microcápsulas (M1 y M2: PHBV, M3 y M4: ácido esteárico, M5: etilcelulosa y M6: alginato) en los diferentes momentos de medida

Para tiempos de 6 horas, la muestra que más cantidad de rifampicina eluyó fue la de microcápsulas de alginato ($28.27 \mu\text{g/ml}$), seguida por las dos muestras de PHBV (15.93 y $15.23 \mu\text{g/ml}$).

Las microcápsulas de alginato mostraron eluciones mayores que el resto de microcápsulas en todos los momentos de medición, siendo las diferencias entre las medias de las concentraciones de rifampicina detectadas estadísticamente significativas ($p=0.0001$). Las microcápsulas de alginato mostraron incrementos de la concentración de rifampicina eluida a lo largo del tiempo, observándose diferencias estadísticamente significativas excepto entre las 48h y 1 s ($p=1$) y entre 2s y 5s ($p=0.101$).

Las muestras de ácido esteárico mostraron de nuevo valores no reproducibles (3.27 y $18.83 \mu\text{g/ml}$), por lo que se descartó este polímero para posteriores análisis; las diferencias entre las medias de concentración de rifampicina de ambas muestras alcanzaron la significación estadística a las 6h, 24h, 48h, 1s y 2s ($p=0.0001$, $p=0.0001$, $p=0.0001$, $p=0.001$ y $p=0.0001$, respectivamente), no siendo estadísticamente significativas las diferencias a las 5 s ($p=0.181$). La muestra de etilcelulosa eluyó $3.70 \mu\text{g/ml}$ a las 6 horas por lo que también se descartó.

A la vista de los resultados observados con los cuatro polímeros empleados para la microencapsulación de la rifampicina, se continuó el estudio con PHBV y alginato, los dos que mostraron mejores resultados de elución en PBS.

Se compararon inicialmente 8 muestras de microcápsulas de PHBV y 4 de alginato. El rendimiento medio de las muestras de PHBV fue 70.51% y de las muestras de alginato fue 135.60%. En las tablas 20 y 21 se muestran las cantidades y el rendimiento de producción cada una de las muestras.

Muestra	Polímero cubierta	Cantidades	Rendimiento producción
1	PHBV	PHBV: 0.96g Rif: 0.12g Masa obtenida: 0.79g	73.25%
2	PHBV	PHBV: 0.91g Rif: 0.11g Masa obtenida: 0.58g	57.12%
3	PHBV	PHBV: 0.90g Rif: 0.10g Masa obtenida: 0.71g	70.42%
4	PHBV	PHBV: 0.90g Rif: 0.11g Masa obtenida: 0.67g	66%
5	PHBV	PHBV: 0.94g Rif: 0.12g Masa obtenida: 0.78g	73.29%
6	PHBV	PHBV: 0.92g Rif: 0.13g Masa obtenida: 0.82g	77.9%
7	PHBV	PHBV: 0.89g Rif: 0.12g Masa obtenida: 0.77g	75.7%
8	PHBV	PHBV: 0.90g Rif: 0.10g Masa obtenida: 0.71g	70.39%
Media		PHBV: 0.92g Rif: 0.11g Masa obtenida: 0.73g	70.51%

Tabla 20. Composición y rendimiento de producción de las diferentes muestras de microcápsulas de PHBV

Muestra	Polímero cubierta	Cantidades	Rendimiento producción
A	Alginato A2158	Alginato: 1.51g Rif: 0.21g Masa obtenida: 2.06g	120%
B	Alginato A2158	Alginato: 1.50g Rif: 0.20g Masa obtenida: 2.17g	127%
C	Alginato A2158	Alginato: 1.50g Rif: 0.20g Masa obtenida: 2.68g	157.4%
D	Alginato A2158	Alginato: 1.51g Rif: 0.20g Masa obtenida: 2.36g	138%
Media		Alginato: 1.50g Rif: 0.20g Masa obtenida: 2.32g	135.6%

Tabla 21. Composición y rendimiento de producción de las diferentes muestras de microcápsulas de alginato

El rendimiento de producción de microcápsulas en las muestras de alginato fue mayor al 100% debido a que el calcio y quitosano que contiene la disolución reticulante pasan a formar parte de la micropartícula. No se pudo cuantificar por separado.

5.2.2 Eficiencia de la microencapsulación de rifampicina

La concentración de de rifampicina (en $\mu\text{g/ml}$) y el porcentaje de rifampicina en las microcápsulas (tras disolver en metanol y diclorometano las microcápsulas de PHBV y en EDTA las de alginato) fue mayor en las microcápsulas de alginato que en las microcápsulas de PHBV ($p=0.0001$), como se refleja en las Tablas 22 y 23 y en la Figura 34. El análisis estadístico se muestra en la Tabla 24. Los datos completos se muestran en las Tabla 25 y 26, en Anexo.

Muestra	CC ($\mu\text{g/ml}$)	Desviación estándar (CC)	%RIF
1	20.40	1.89	2.04
2	16.20	1.71	1.62
3	21.17	0.78	2.12
4	15.17	0.32	1.52
5	19.30	0.79	1.93
6	15.80	0.96	1.58
7	15.63	2.95	1.56
8	15.97	1.006	1.59
Media	17.68	2.71	1.75

Tabla 22. Valores medios de las concentraciones ($\mu\text{g/ml}$), desviación estándar y porcentaje de rifampicina encapsulada en cada una de las 8 muestras de microcápsulas de PHBV. CC: concentración; Abs: absorbancia; RIF: rifampicina

Muestra	CC (µg/ml)	Desviación estándar (CC)	%RIF
9	69.40	6.088	6.94
10	60.32	5.15	6.032
11	47.58	2.46	4.76
12	35.78	2.44	3.58
Media	53.27	13.65	5.33

Tabla 23. Valores medios de las concentraciones (µg/ml), desviación estándar y porcentaje de rifampicina en cada una de las 4 muestras de microcápsulas de alginato. CC: concentración; Abs: absorbancia; RIF: rifampicina

Muestra	N	Media	Desviación estándar
PHBV	26	17.68	2.71
Alginato	20	53.27	13.66
Total	46	33.15	20.025

Tabla 24. Análisis estadístico descriptivo de las concentraciones (µg/ml) de rifampicina de las microcápsulas de PHBV y alginato, donde N es el número de veces que se realizó la medida

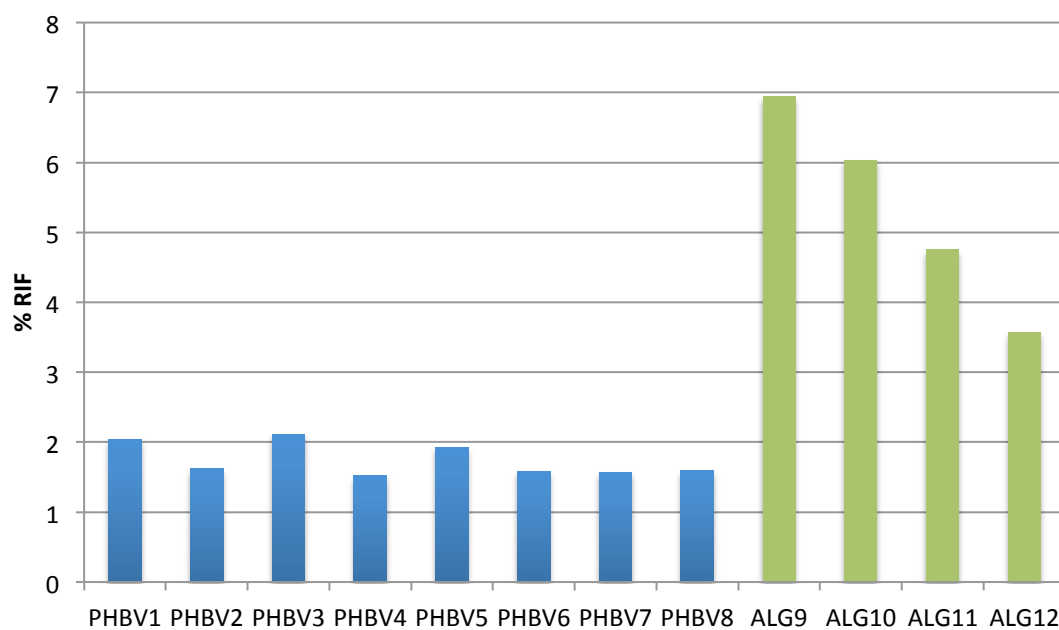


Figura 34. Porcentaje de rifampicina en las diferentes muestras de microcápsulas de PHBV (muestras 1-8) y alginato (muestras 9-12)

5.2.3 Rendimiento de la encapsulación con PHBV y alginato

Las microcápsulas de alginato mostraron mayor rendimiento de encapsulación que las de PHBV (60.03% frente a 11.13% de media, respectivamente). Los datos del rendimiento de encapsulación se muestran en las Tablas 27 y 28.

Muestra	Polímero cubierta	RIF de partida (g)	RIF encapsulada (g)	Rendimiento encapsulación
1	PHBV	0.12	0.016	13.53%
2	PHBV	0.11	0.009	8.55%
3	PHBV	0.10	0.015	14.63%
4	PHBV	0.11	0.010	9.43%
5	PHBV	0.12	0.015	12.69%
6	PHBV	0.13	0.013	9.98%
7	PHBV	0.12	0.012	10.40%
8	PHBV	0.10	0.011	9.79%
Media		0.11	0.013	11.13%

Tabla 27. Rendimiento de encapsulación de rifampicina de las muestras de PHBV

Muestra	Polímero cubierta	RIF de partida (g)	RIF encapsulada (g)	Rendimiento producción
A	Alginato A2158	0.21	0.14	69.2%
B	Alginato A2158	0.20	0.13	65.4%
C	Alginato A2158	0.20	0.13	63.4%
D	Alginato A2158	0.20	0.084	42,1%
Media		0.20	0.12	60.03%

Tabla 28. Rendimiento de encapsulación de rifampicina de las muestras de alginato

5.2.4 Elución de las microcápsulas de PHBV y alginato en PBS

Las microcápsulas de alginato eluyeron más rifampicina en PBS a las 6 h (35.97, 35.10 y 27.50 $\mu\text{g/mL}$, desviación estándar 5.96, 6.23 y 1.22 respectivamente) como era de esperar ya que contenían más rifampicina que las de PHBV (8.23, 10.53 y 10.23 $\mu\text{g/mL}$, desviación estándar 0.95, 0.81 y 1.36 respectivamente).

Los valores medios de las concentraciones y la absorbancia de la rifampicina eluída en cada momento de medición para las microcápsulas de PHBV y alginato se muestran en las Tablas 29 y 30, y la representación gráfica de la elución de cada tipo de micropartículas en las Figuras 35 y 36. La representación gráfica global de las 6 muestras se incluye en la Figura 37, en Anexo.

Muestra	6 h		24 h		48 h		1 semana	
	CC media ($\mu\text{g/mL}$)	SD	CC media ($\mu\text{g/mL}$)	SD	CC media ($\mu\text{g/mL}$)	SD	CC media ($\mu\text{g/mL}$)	SD
PHBV1	8.23	0.95	12.73	1.68	13.63	3.25	19.10	1.21
PHBV2	10.53	0.81	17.67	2.65	16.40	1.60	16.17	2.25
PHBV3	10.23	1.36	14.10	0.2	18.83	2.25	17.23	1.02
Media	9.66	1.25	14.83	2.55	16.29	2.60	17.50	1.48

Tabla 29. Concentraciones medias (CC), en $\mu\text{g/mL}$ y desviación estándar (SD) de la rifampicina eluída de las microcápsulas de PHBV. Se estudiaron tres ejemplares de tres muestras (1, 2 y 3) de micropartículas de PHBV (que corresponden a diferentes lotes)

Muestra	6 h		24 h		48 h		1 semana	
	CC media (µg/ml)	SD	CC media (µg/ml)	SD	CC media (µg/ml)	SD	CC media (µg/ml)	SD
ALG4	35.97	5.96	54.80	2.10	72.70	3.83	70.87	3.75
ALG5	35.10	6.23	55.70	6.82	71.07	11.32	78.17	7.34
ALG6	27.50	1.23	47.20	2.90	56.63	2.53	51.03	3.51
Media	32.85	4.66	52.57	4.67	66.69	9.03	66.69	14.04

Tabla 30. Concentraciones medias (CC) en µg/ml y desviación estándar (SD) de la rifampicina eluída de las microcápsulas de alginato. Se estudiaron tres ejemplares de tres muestras (4,5 y 6) de micropartículas de alginato (que corresponden a diferentes lotes)

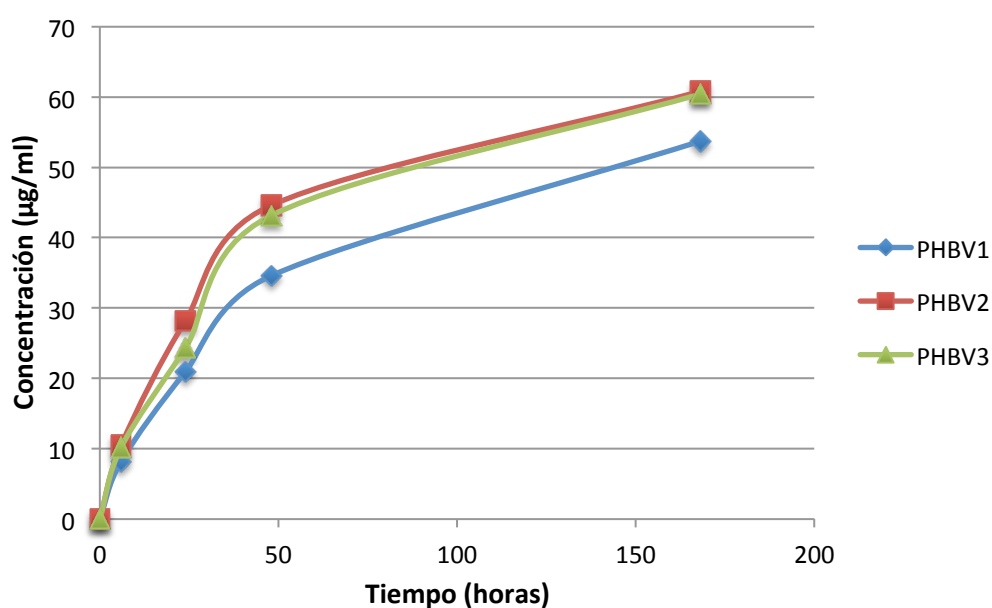


Figura 35. Elución de rifampicina de las microcápsulas de PHBV a lo largo del tiempo (1, 2 y 3 corresponden a tres muestras diferentes)

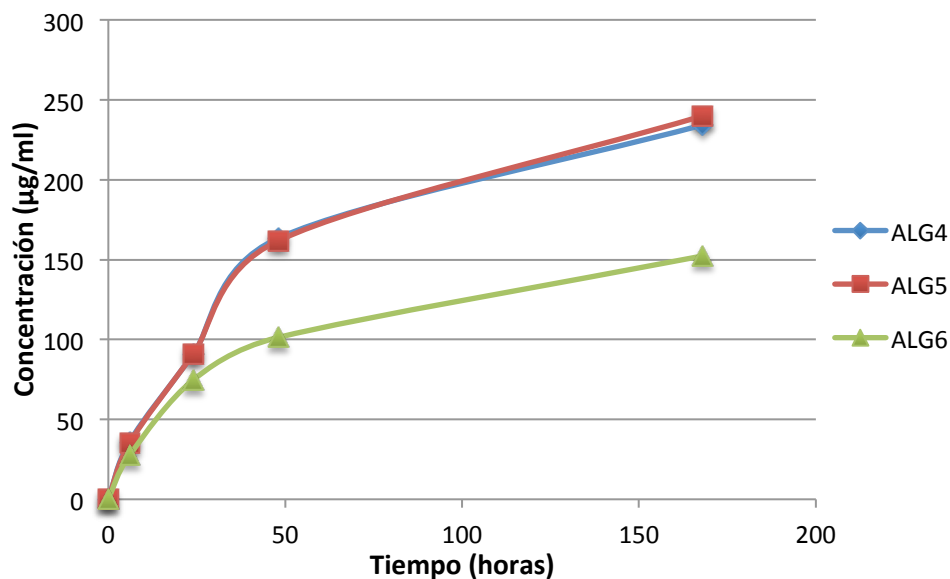


Figura 36. Elución de rifampicina de las microcápsulas de alginato a lo largo del tiempo (4, 5 y 6 corresponden a tres muestras diferentes)

Se alcanzaron diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de rifampicina en PBS eluída por las microcápsulas de alginato y por las de PHBV a las 6h, 24h, 48h y a la semana (Tabla 31). Los niveles de significación estadística alcanzados por los diferentes subgrupos se muestran en las Tablas 32-35, en Anexo. En las Tablas 36 y 37, en Anexo, se muestran los valores de concentración y absorbancia para todas las muestras en todos los momentos de medida.

Tiempo	Nivel de significación
6h	0.001
24h	0.0001
48h	0.001
1s	0.004

Tabla 31. Niveles de significación estadística resultantes de la comparación de las medias de todas las muestras de PHBV y de todas las muestras de alginato, en los diferentes momentos de medida

5.3 Ensayos de elución en cemento

Las muestras de cemento con microcápsulas de alginato mostraron mayor elución de rifampicina que las muestras de cemento con microcápsulas de PHBV y que las de cemento con rifampicina sin encapsular, en todos los momentos de medición (Tabla 38).

Muestra	6h		24h		48h		1s	
	CC media (µg/ml)	SD	CC media (µg/ml)	SD	CC media (µg/ml)	SD	CC media (µg/ml)	SD
Rif	0	0	0	0	0	0	0.6	0.082
PHBV	0.01	0.032	0	0	0	0	0.27	0.16
Alginato	1.96	1.52	2.45	1.45	1.25	0.98	3.43	2.53

Tabla 38. Concentraciones medias (CC) en µg/ml y desviación estándar (SD) de la rifampicina eluída de las probetas de cemento con rifampicina, con microcápsulas de PHBV y con microcápsulas de alginato, en los diferentes momentos de medida

Estas diferencias fueron estadísticamente significativas al comparar la concentración de rifampicina eluída del cemento con microcápsulas de alginato y del cemento con rifampicina en todos los momentos de medida. También se alcanzó la significación estadística al comparar la rifampicina eluída del cemento con microcápsulas de alginato y la eluída del cemento con microcápsulas de PHBV a las 6h, 24h, 48h y 1s (Tabla 39).

	6h	24h	48h	1s
Rif-PHBV	1	1	1	1
Rif-Alg	0.005	0.0001	0.007	0.011
PHBV-Alg	0.0001	0.0001	0.001	0.0001

Tabla 39. Niveles de significación estadística obtenidos al comparar la concentración eluída de rifampicina por las distintas probetas de cemento. Rif: rifampicina sin encapsular; PHBV: microcápsulas de PHBV; Alg: microcápsulas de alginato

Los datos completos de la cantidad de rifampicina detectada en PBS con las muestras de cemento con rifampicina sin encapsular, en los diferentes momentos de medida, se muestra en la Tabla 40 y se representa en la Figura 38, en Anexo. La rifampicina no comenzó a eluir del cemento hasta una semana después y lo hizo en pequeña cantidad (0.6 µg/ml).

Las concentraciones y absorbancia de rifampicina en PBS cuando se introdujeron las muestras de cemento con microcápsulas de PHBV se exponen en la Tabla 41, en Anexo. Se muestran los resultados de 4 lotes de microcápsulas y 4 o 5 muestras de cemento por cada lote. La Figura 39, en Anexo, representa la elución de estas muestras a lo largo del tiempo.

Todos los valores de las concentraciones y absorción de rifampicina eluídas de muestras de cemento con microcápsulas de alginato se muestran en la Tabla 42, en Anexo. Se estudiaron 3 lotes de microcápsulas y 5 muestras de cemento por cada lote. En la Figura 40, en Anexo, se representa la elución de rifampicina de las probetas de cemento con microcápsulas de alginato a lo largo del tiempo.

La representación gráfica de la elución de rifampicina a lo largo del tiempo, en los diferentes momentos de medida se muestran en la Figura 41.

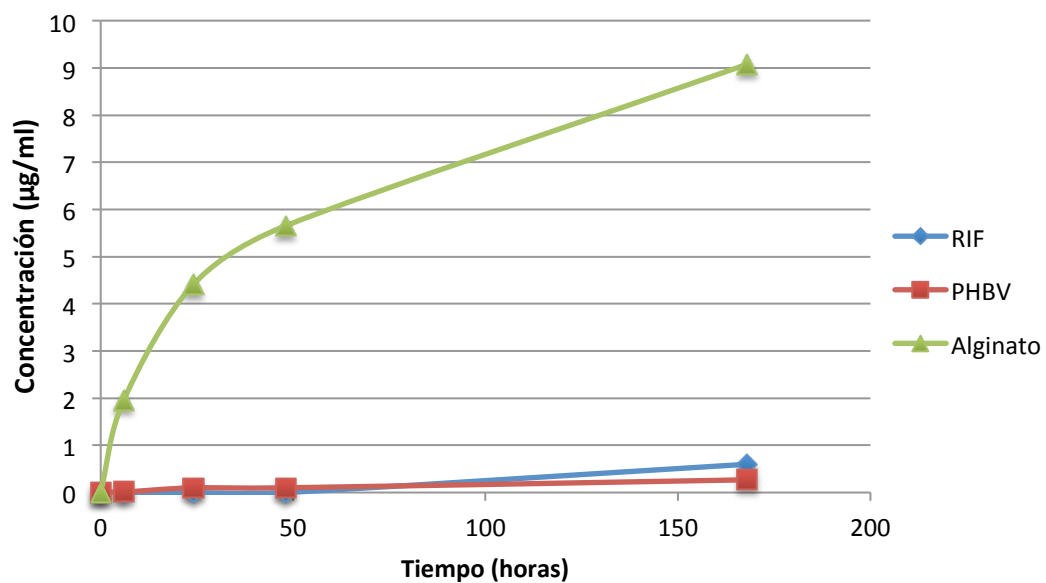


Figura 41. Concentraciones medias de rifampicina (en µg/ml) detectadas en PBS con las muestras de cemento con rifampicina sin encapsular (RIF), microcápsulas de PHBV (PHBV) y microcápsulas de alginato, en los diferentes momentos de medida

5.4 Ensayos mecánicos

5.4.1 Ensayos de compresión

Los cementos con microcápsulas de PHBV y alginato mostraron menor resistencia a la compresión que el cemento control (cemento CMW®1 sin adición de antibióticos) (reducción del 14%). El cemento con rifampicina sin encapsular mostró una reducción de la resistencia a la compresión del 30% respecto al cemento control (Tabla 43 y Figura 42).

	Resistencia a compresión (MPa)	Desviación	Variación respecto al control
Control	106.2	2.97	
RIF	74.04	3.57	-30%
PHBV	91.26	5.13	-13.9%
Alginato	91.35	6.29	-13.8%

Tabla 43. Resistencia a compresión (MPa) de los cementos control, con rifampicina sin encapsular (RIF), con microcápsulas de PHBV y con microcápsulas de alginato

Se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas al comparar los valores medios de la resistencia a compresión entre las probetas control-rifampicina, control-PHBV, control-alginato, rifampicina-PHBV y rifampicina-alginato (en todos $p=0.0001$). No se alcanzó la significación estadística en la comparación PHBV-alginato ($p=1$).

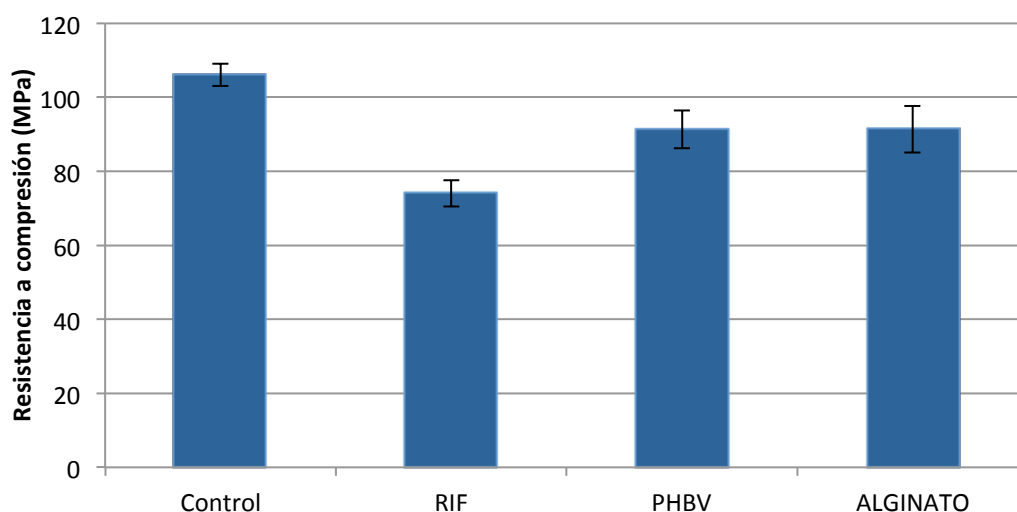


Figura 42. Resistencia a compresión (MPa) de las muestras de cemento con rifampicina (RIF), cemento con microcápsulas de PHBV, cemento con alginato y cemento control, en los ensayos de compresión

5.4.2 Ensayos de flexión

La mayor resistencia a la flexión se observó con las probetas de cemento control (sin rifampicina). La resistencia a la flexión del cemento con microcápsulas de PHBV se vio reducida un 9.5% respecto al cemento control. En el caso del cemento con rifampicina sin encapsular la resistencia a la flexión disminuyó un 16%. La menor resistencia a la flexión se observó en el cemento con microcápsulas de alginato (reducción del 18.2%) (Tabla 44 y Figura 43).

	Resistencia a flexión (MPa)	Desviación	Variación respecto al control
Control	54.66	2.82	
RIF	46.04	3.79	-16%
PHBV	49.46	5.95	-9.5%
Alginato	44.72	3.99	-18.2%

Tabla 44. Valores medios de resistencia a la flexión de los cementos estudiados (MPa), desviación estándar y reducción de la resistencia respecto al cemento control

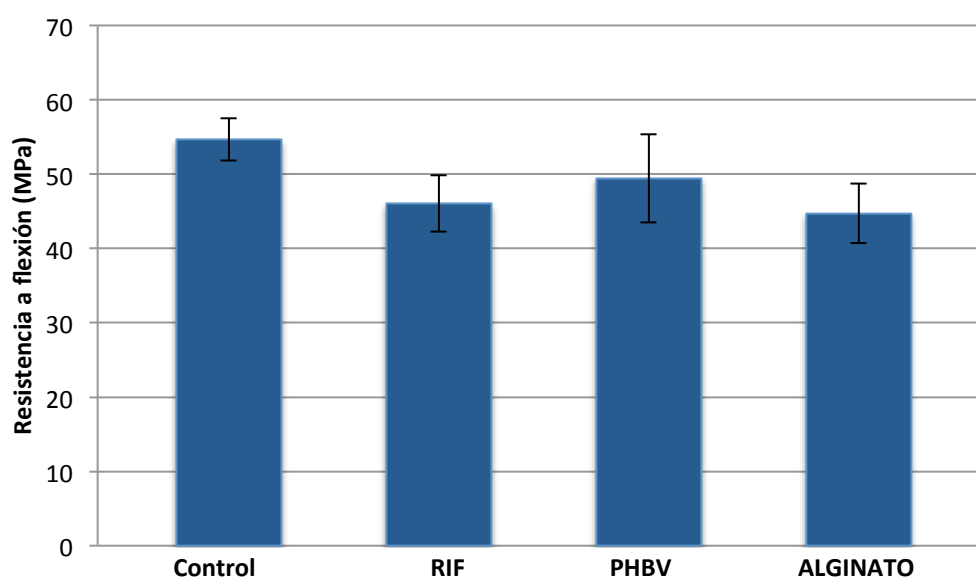


Figura 43. Resistencia a flexión (MPa) de las muestras de cemento con rifampicina (RIF), cemento con microcápsulas de PHBV, cemento con alginato y cemento control, en los ensayos de flexión

También se calcularon los valores medios y la desviación estándar de la fuerza máxima y del módulo de elasticidad o de flexión, obtenidos con las probetas de cemento estudiadas (Tablas 45 y 46 y Figuras 44 y 45), observándose que la microencapsulación de la rifampicina permite un menor deterioro de las propiedades mecánicas de flexión del cemento óseo, en comparación con la rifampicina sin encapsular. De hecho, la microencapsulación con PHBV y alginato no alteró el módulo de elasticidad respecto al cemento control.

	Fmáx (N)	Desviación	Variación respecto al control
Control	197.05	21.34	
RIF	164.35	14.52	-16.59%
PHBV	183.21	27.89	-7.02%
Alginato	176.92	19.65	-10.21%

Tabla 45. Valores medios de la fuerza máxima soportada (N), desviación estándar y reducción de la fuerza máxima respecto al control

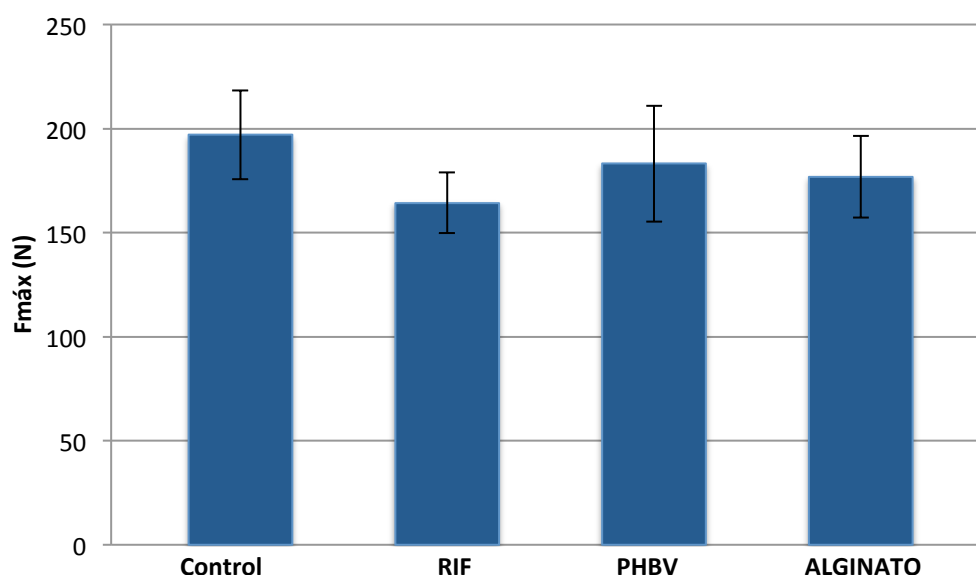


Figura 44. Fuerza máxima (N) de las muestras de cemento con rifampicina (RIF), cemento con microcápsulas de PHBV, cemento con alginato y cemento control, en los ensayos de flexión

	Módulo de flexión (MPa)	Desviación	Variación respecto al control
Control	2898	496	
RIF	2371	207	-18.18%
PHBV	3026	433	4.42%
Alginato	2937	245	1.34%

Tabla 46. Valores medios de los módulos máximos de flexión (MPa) de las probetas de cemento estudiadas, desviación estándar y reducción respecto al control

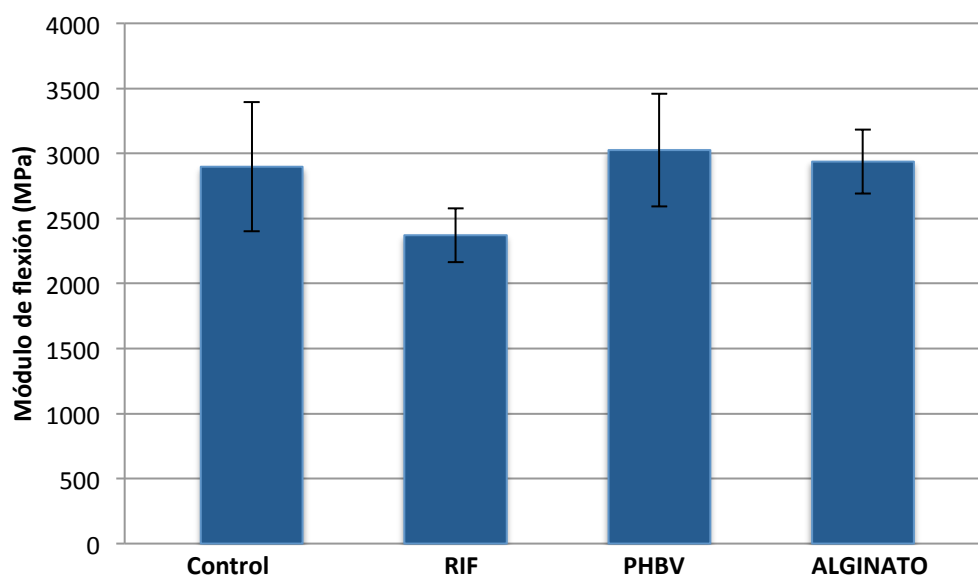


Figura 45. Módulo de flexión (MPa) de las muestras de cemento con rifampicina (RIF), cemento con microcápsulas de PHBV, cemento con alginato y cemento control, en los ensayos de flexión

Los resultados de fuerza máxima, tensión máxima y módulo de elasticidad de todas las probetas ensayadas se muestran en las Tablas 47-50, en Anexo.

Las diferencias entre los valores medios de la fuerza máxima de las probetas estudiadas no alcanzaron la significación estadística ($p=1$, $p=0.307$, $p=0.425$, $p=0.940$ y $p=1$ en las comparaciones control-PHBV, control-alginato, rifampicina-PHBV, rifampicina-alginato y PHBV-alginato respectivamente). Sólo en la comparación de la fuerza máxima entre las probetas control y las probetas con rifampicina sin encapsular se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ($p=0.031$).

Al comparar los valores medios de tensión máxima de las probetas se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las probetas control y las probetas con rifampicina ($p=0.003$) y entre las probetas control y las probetas con alginato ($p=0.0001$). El resto de comparaciones no mostraron diferencias estadísticamente significativas (control-PHBV, rifampicina-PHBV, rifampicina-alginato y PHBV-alginato; $p=0.186$, $p=0.652$, $p=1$ y $p=0.09$ respectivamente).

En la comparación de los valores medios de los módulos de elasticidad se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las probetas control-rifampicina, rifampicina-PHBV y rifampicina-alginato ($p=0.027$, $p=0.001$ y $p=0.001$ respectivamente). No se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre las probetas control-PHBV, control-alginato y PHBV-alginato ($p=1$ en los tres casos).

5.4.3 Ensayos de dureza y tiempo de fraguado

El tiempo de fraguado del cemento con la rifampicina sin microencapsular es mayor que el del cemento con rifampicina microencapsulada en PHBV y alginato, y que el del cemento control.

La dureza del cemento con microcápsulas de alginato fue similar en todos los momentos estudiados a la del cemento control (cemento CMW®1 sin aditivos) (73 H_D), alcanzando la dureza máxima desde el primer momento de medida (15 minutos). El cemento con microcápsulas de PHBV mostró una menor dureza en las primeras dos horas pero posteriormente fue similar a la del cemento con microcápsulas de alginato y a la del cemento control. La evolución de la dureza a lo largo del tiempo se muestra en la Figura 46.

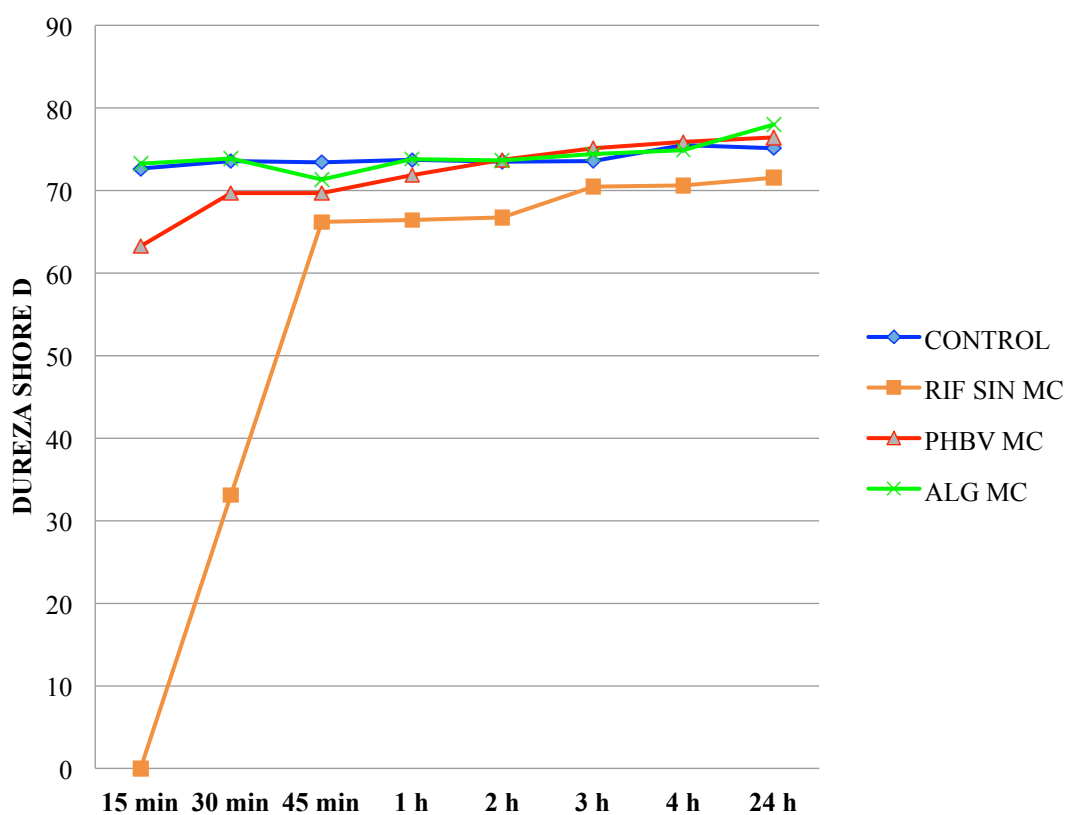


Figura 46. Dureza adquirida por los distintos cementos estudiados a lo largo del tiempo (medido en unidades de dureza)

El cemento con rifampicina sin encapsular comenzó a adquirir dureza a los 30 minutos (33 H_D) y no alcanzó una dureza próxima a la del cemento control hasta los 45 minutos (67 H_D). No pudo ensayarse a los 15 minutos al estar demasiado líquido.

Pasados 45 minutos desde el final de la fase de mezclado, el cemento adquirió su consistencia final en todos los casos excepto en el cemento con rifampicina sin encapsular.

Este ensayo permitió comprobar que a los 30 minutos tras la fabricación del cemento, el cemento con rifampicina sin encapsular se encontraba a menos del 50% del fraguado final, mientras que el resto se encontraba entre el 91% (cemento con microcápsulas de PHBV) y el 98% en el caso del cemento control.

Los valores medios de los ensayos de flexión pasados 45 minutos desde la fabricación del cemento se muestran en las Tablas 51-53 y su representación gráfica en las Figuras 47-49. Los datos completos se muestran en las Tablas 54-57, en Anexo.

El cemento con microcápsulas de alginato mostró una reducción de la tensión máxima del 20.61% respecto al cemento control. El cemento con microcápsulas de PHBV mostró una reducción de la tensión máxima del 22.71% respecto al cemento control, pero la mayor reducción de la tensión se observó en el caso del cemento con rifampicina sin encapsular (55%).

	Resistencia a flexión (MPa)	Desviación	Variación respecto al control
Control	50.93	1.76	
RIF	22.87	6.84	-55.09%
PHBV	39.36	4.36	-22.71%
Alginato	40.43	4.72	-20.61%

Tabla 51. Valores medios de resistencia a la flexión (MPa), desviación estándar y reducción de la resistencia de los cementos estudiados respecto al cemento control, a los 45 minutos de la fabricación de las probetas

	Fmáx (N)	Desviación	Variación respecto al control
Control	198.53	14.46	
RIF	91	18.31	-54.16%
PHBV	149.13	20.97	-24.83%
Alginato	158.15	25.02	-20.34%

Tabla 52. Valores medios de la fuerza máxima soportada (N), desviación estándar y reducción de la fuerza máxima respecto al control, a los 45 minutos de la fabricación de las probetas

	Módulo de flexión (MPa)	Desviación	Variación respecto al control
Control	2333	41	
RIF	954	279	-59.11%
PHBV	1844	216	-20.96%
Alginato	2158	195	-7.5%

Tabla 53. Valores medios de los módulos máximos de flexión (MPa) de las probetas de cemento estudiadas, desviación estándar y reducción respecto al control, a los 45 minutos de la fabricación de las probetas

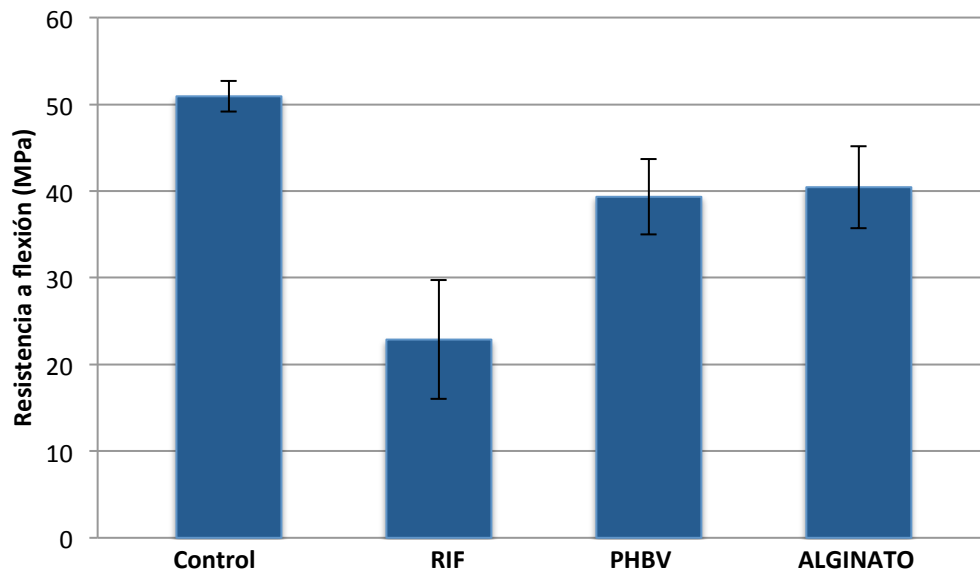


Figura 47. Resistencia a la flexión (MPa) de las muestras de cemento con rifampicina (RIF), cemento con microcápsulas de PHBV, cemento con alginato y cemento control, a los 45 minutos de la fabricación de las probetas

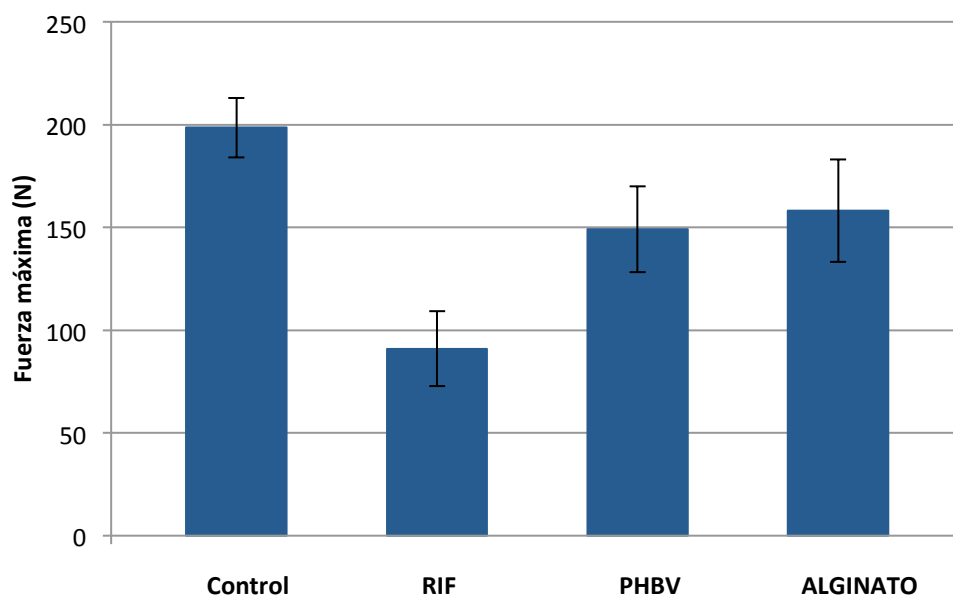


Figura 48. Fuerza máxima (N) de las muestras de cemento con rifampicina (RIF), cemento con microcápsulas de PHBV, cemento con alginato y cemento control, a los 45 minutos de la fabricación de las probetas

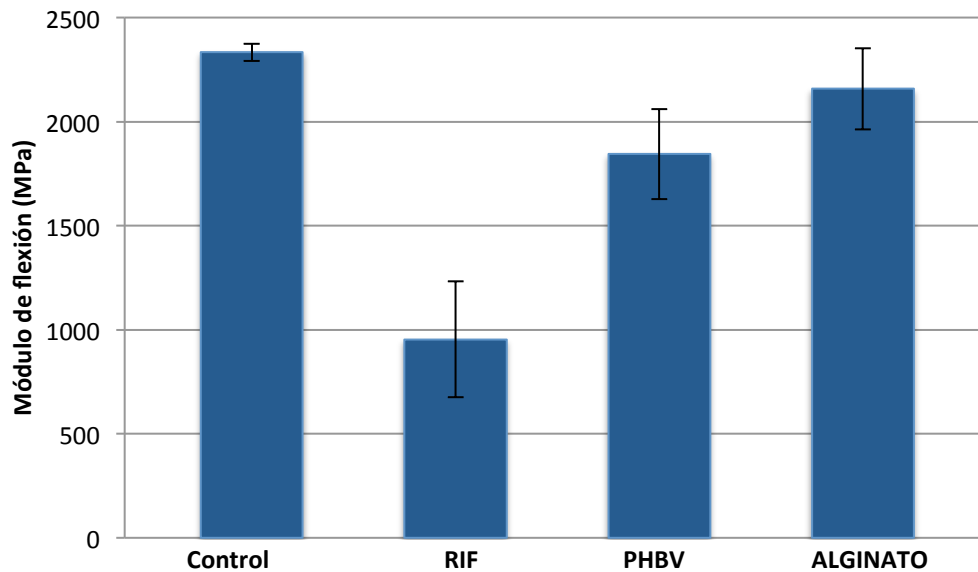


Figura 49. Módulo de flexión (MPa) de las muestras de cemento con rifampicina (RIF), cemento con microcápsulas de PHBV, cemento con alginato y cemento control, a los 45 minutos de la fabricación de las probetas

En cuanto a la fuerza máxima ($F_{\text{máx}}$) alcanzada se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre las probetas de cemento control y cemento con rifampicina sin encapsular ($p=0.0001$), cemento control y cemento con microcápsulas de PHBV ($p=0.026$), cemento con rifampicina sin encapsular y cemento con microcápsulas de PHBV ($p=0.009$) y cemento con rifampicina sin encapsular y cemento con microcápsulas de alginato ($p=0.05$). Las diferencias entre la fuerza máxima de las probetas control-alginato y PHBV-alginato no alcanzaron la significación estadística ($p=0.123$ y $p=1$, respectivamente).

Respecto a la tensión máxima, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las probetas control-rifampicina, control-PHBV, rifampicina-PHBV y rifampicina-alginato ($p=0.0001$, $p=0.034$, $p=0.003$ y $p=0.003$, respectivamente). No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre las probetas de PHBV-alginato ($p=1$) ni entre las probetas control-alginato ($p=0.09$).

Se observaron diferencias que alcanzaron la significación estadística entre los módulos de elasticidad de las probetas control-rifampicina, control-PHBV, rifampicina-PHBV y rifampicina-alginato ($p=0.0001$, $p=0.036$, $p=0.0001$ y $p=0.0001$, respectivamente). Las diferencias entre los módulos de elasticidad de las probetas control-alginato y PHBV-alginato no fueron estadísticamente significativas ($p=1$ y $p=0.410$, respectivamente).

Ninguna de las 4 muestras de cemento con rifampicina sin encapsular se rompió, sólo sufrió deformación (Figura 50). El ensayo se detuvo por el inminente choque entre el punto de flexión superior e inferior.

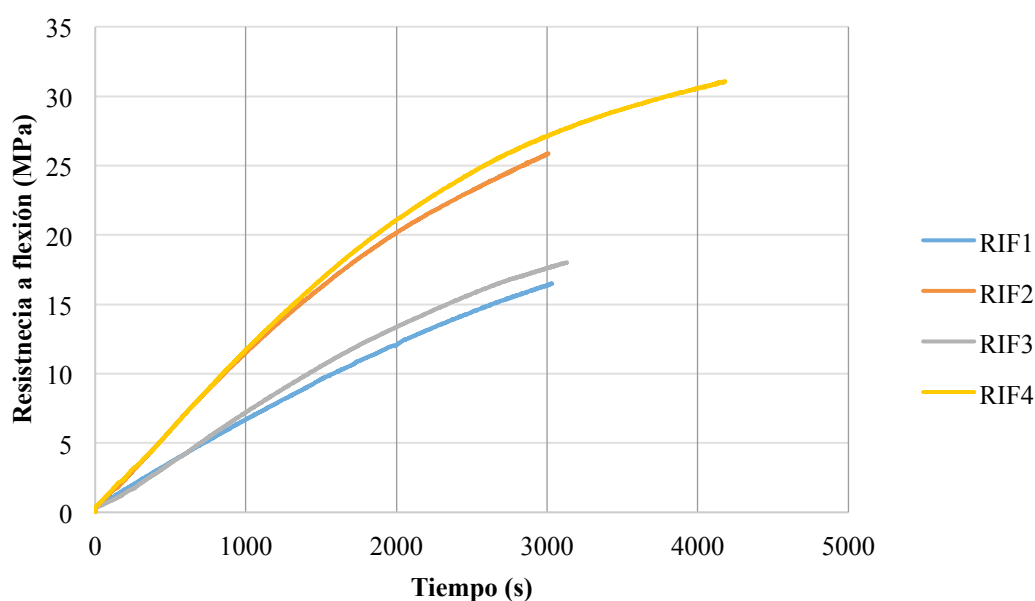


Figura 50. Evolución de la tensión a lo largo del tiempo de fraguado en el cemento con rifampicina sin encapsular (4 muestras distintas)

5.5 Ensayos microbiológicos

Los diámetros de los halos de inhibición medidos por los distintos observadores se muestran en la Tabla 58, en Anexo. Los valores medios para cada grupo, así como la desviación estándar, quedan reflejados en la Tabla 59.

	N	Media (mm)	Desviación estándar
Grupo 1 (RIF)	6	9.33	4.41
Grupo 2 (ALG)	9	20.78	3.23
Grupo 3 (PHBV)	9	4.89	2.93

Tabla 59. Valores medios de los halos de inhibición (mm) y desviación estándar para cada grupo. N: número de veces que se midió

Los halos de inhibición observados en la muestra de cemento con microcápsulas de alginato fueron mayores que en las muestras de cemento sin microcápsulas y en las de cemento con microcápsulas de PHBV (Figura 51).

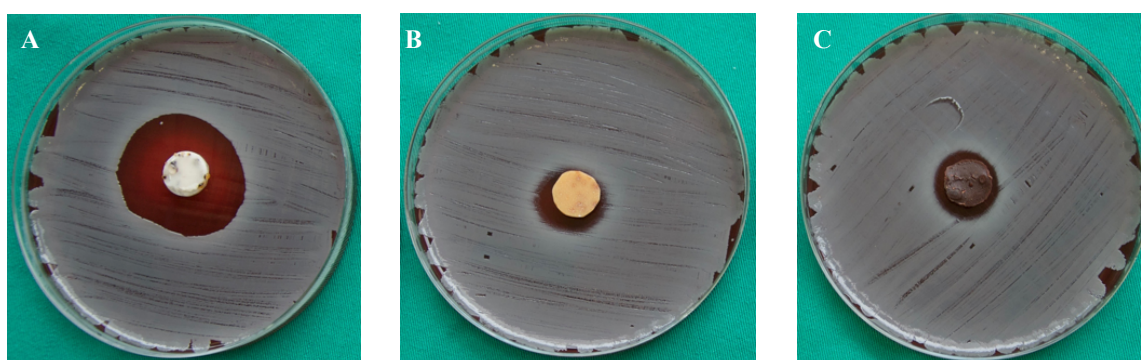


Figura 51. Placas de Petri donde se observan los halos de inhibición producidos por las muestras de cemento con microcápsulas de alginato (A), PHBV (B) y sin microcápsulas (C)

No se observaron diferencias cualitativas importantes entre los halos de inhibición producidos por los distintos lotes de microcápsulas en los grupos 2 (alginato) y 3 (PHBV). El grupo 3 mostró baja capacidad de difusión de la rifampicina del cemento con microcápsulas de PHBV. El halo de inhibición fue menor de 5 mm (Figura 52).

Se observaron diferencias estadísticamente significativas al comparar los valores medios de los halos de inhibición de las muestras de cemento con rifampicina sin encapsular y cemento con microcápsulas de alginato ($p=0.0001$), así como entre las muestras de cemento con microcápsulas de alginato y de PHBV ($p=0.0001$). No se alcanzó la significación estadística entre los halos de inhibición de las muestras de rifampicina sin encapsular y PHBV ($p=0.07$).

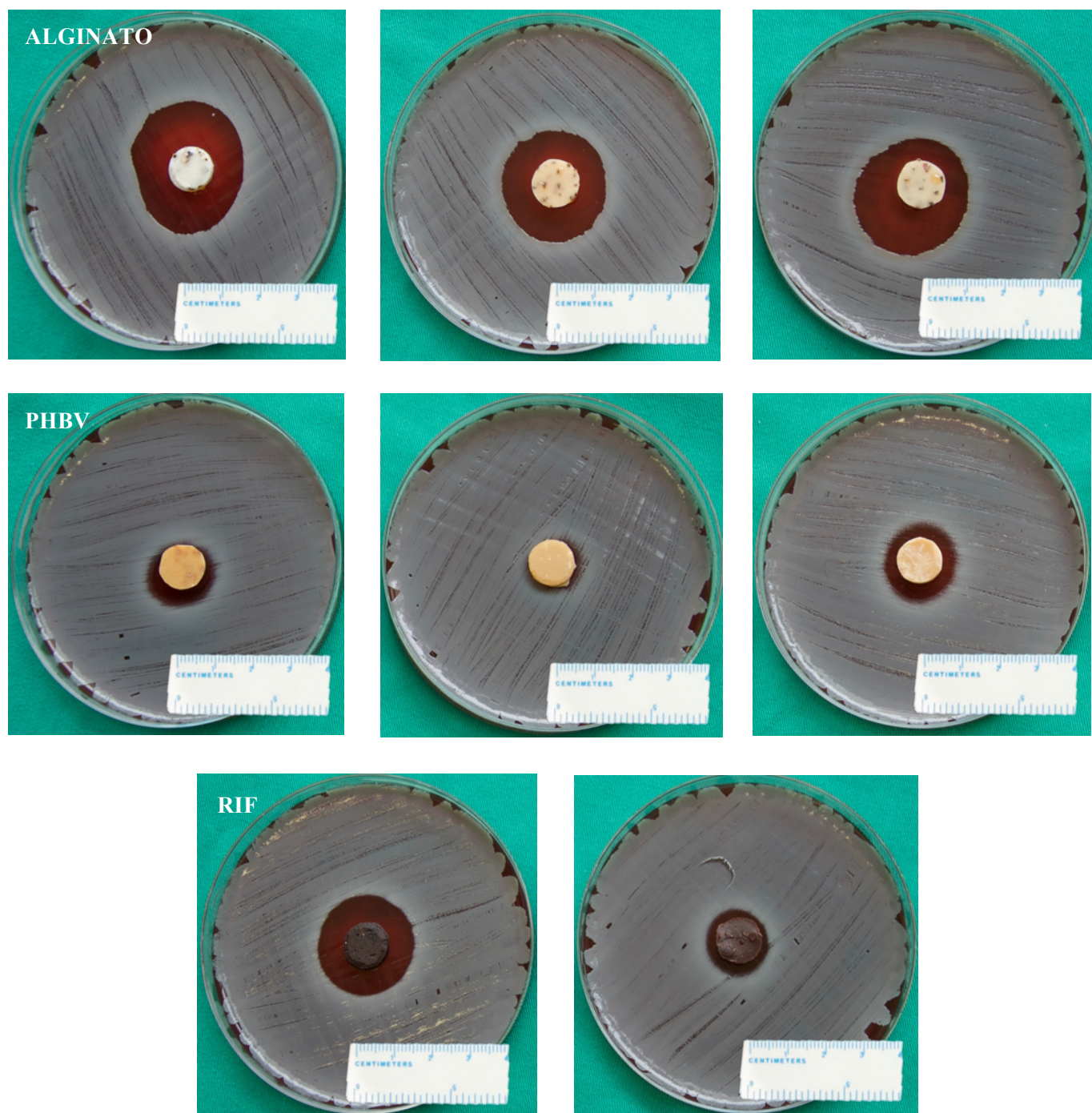


Figura 52. Halos de inhibición producidos por el cemento con microcápsulas de alginato, PHBV y rifampicina sin encapsular (RIF) (3 lotes de microcápsulas por cada tipo)

DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

6.1 La base del problema: la inhibición de la polimerización del cemento al añadir rifampicina

En las últimas décadas ha habido un creciente interés por añadir diferentes antibióticos al cemento óseo con el fin de utilizarlo en el tratamiento de las infecciones protésicas en cirugía ortopédica. El aumento de la resistencia de los microorganismos así como la complejidad de los pacientes, obliga a modificar los espaciadores y los antibióticos que en ellos se utilizan. Numerosos estudios han valorado las propiedades mecánicas, la cinética de elución y la actividad antimicrobiana de los cementos cuando son cargados con distintos antibióticos (69, 71, 175).

Este interés por añadir al cemento óseo antibióticos, especialmente aquellos con elevada actividad antiestafilocócica, como el linezolid, las quinolonas o la rifampicina, manteniendo adecuadas propiedades farmacocinéticas y antimicrobianas, es patente en la bibliografía de los últimos años (8). Anagnostakos et al. demostraron la eficacia *in vitro* de un espaciador con gentamicina y linezolid frente a MRSA (5). Matos et al. describieron recientemente un nuevo sistema de liberación de levofloxacino mediante partículas de fosfato cálcico que se añaden al cemento óseo (134).

La adición de rifampicina al PMMA plantea un problema ya que inhibe o al menos retrasa su completa polimerización (8), efecto que no ocurre con otros antibióticos como cefazolina, ciprofloxacino, gatifloxacino, levofloxacino o linezolid. La rifampicina impide que los iniciadores reaccionen con el PMMA y de esta forma se inhibe la reacción de polimerización.

Han et al. calcularon el retraso en el tiempo de fraguado (122.5 ± 31.1 minutos) (89), principal motivo que impide su utilización como espaciador en las infecciones protésicas, ya que no es aceptable esperar ese tiempo en quirófano antes de su implantación, a pesar de haber mostrado buenas tasas de liberación in vitro (4) y una adecuada actividad antimicrobiana frente a *S. aureus* (52), el microorganismo más frecuentemente responsable de las infecciones protésicas.

En los ensayos mecánicos de nuestro estudio, se observó que la vehiculización de la rifampicina dentro de microcápsulas permite que el cemento óseo alcance propiedades mecánicas aptas para la fabricación de espaciadores. La dureza del cemento con microcápsulas de alginato fue similar a la del cemento control (CMW®1 sin aditivos) en todos los momentos de medida, alcanzando la dureza máxima a los 15 minutos del ensayo. En el caso del cemento con microcápsulas de PHBV, mostró menor dureza en las dos primeras horas del ensayo pero después adquirió una dureza similar a la del cemento con microcápsulas de alginato y a la del cemento control. Comprobamos que el cemento con rifampicina sin encapsular comenzaba a adquirir dureza a los 30 minutos y no alcanzaba una dureza similar a la del cemento control hasta los 45 minutos del ensayo, no siendo posible por tanto, su uso para la fabricación de espaciadores de cemento.

6.2 Vehiculización de la rifampicina

La vehiculización se define como el transporte de fármacos a través de dispositivos que permiten la introducción de una sustancia terapéutica, mejorando la eficacia y seguridad de la misma, controlando la velocidad, el tiempo y el lugar de liberación del fármaco. El avance en los nuevos sistemas transportadores de fármacos, como coloides poliméricos (polímeros, copolímeros, dendrímeros, hidrogeles), sistemas vesiculares (liposomas, niosomas), nanopartículas sólidas lipídicas y metales (oro, plata), entre otros, está aumentando las posibilidades de éxito terapéutico en diversas patologías (80). El propio cemento óseo es considerado un vehículo de fármacos, principalmente antibióticos, aunque se está estudiando como vector de antineoplásicos en el tratamiento de metástasis óseas (109).

La microencapsulación es una técnica descrita para vehiculizar medicamentos y otras sustancias que consiste en su recubrimiento bajo la forma de moléculas, partículas sólidas o glóbulos líquidos, con materiales de distinta naturaleza, para dar lugar a partículas de tamaño micrométrico. La idea de microencapsular medicamentos surgió a mediados de la década de los 50, cuando una compañía farmacéutica introdujo esta tecnología con la finalidad de conseguir una liberación sostenida de los medicamentos. Con esa intención y la de prevenir la irritación gástrica fue microencapsulada la aspirina, la cual aparece citada en la bibliografía como uno de los primeros medicamentos microencapsulados (20).

La microencapsulación de los antibióticos tiene como potenciales ventajas permitir la liberación controlada del principio activo, mejorar la compatibilidad con el cemento óseo, proteger el antibiótico evitando la inactivación temprana, disminuir la carga antibiótica reduciendo la resistencia a antibióticos, y proporcionar unas

propiedades ajustadas (tamaño de la partícula, material de la cápsula, condiciones de liberación...). Los materiales poliméricos se posicionan como unos de los mejores materiales para microencapsular antibióticos en el cemento óseo. En nuestro estudio se crearon y estudiaron micropartículas con cuatro polímeros distintos: alginato, PHBV, ácido esteárico y etilcelulosa, aunque sólo fueron añadidos al cemento óseo los dos primeros al ser los que mejor liberaban la rifampicina en los ensayos iniciales. En relación a la adición de microcápsulas al cemento óseo como vehículo de antibióticos sólo hemos encontrado una referencia en la bibliografía, Shi et al. añadieron microesferas de PLGA (poli-láctico-co-glicólico) conteniendo colistina al PMMA, para la fabricación de espaciadores en defectos óseos craneofaciales (180), pero el PLGA favorecía la lisis celular y el exudado seroso mantenido.

Además de la microencapsulación, otros mecanismos han sido probados con el objetivo de mejorar las propiedades del cemento cargado con antibióticos. Sustancias como sucrosa, xilitol y eritriol, han sido añadidas al cemento óseo con el fin de mejorar las propiedades de elución de los antibióticos aumentando su porosidad (136). Beenken et al. comprobaron que el xilitol, que además tiene propiedades antibacterianas intrínsecas y previene la formación del biofilm, aumentaba la elución de daptomicina en el cemento óseo en la osteomielitis crónica (17). Sin embargo, su uso se vio limitado debido a la reducción de la resistencia del cemento (149). Frank et al. crearon cápsulas de PMMA con sorbitol para liberar clindamicina en el cemento (67).

La rifampicina ya ha sido microencapsulada mediante distintas técnicas para su uso en otras patologías, fundamentalmente la tuberculosis pulmonar. Kamath et al. (108) describieron la técnica de microencapsulación de la rifampicina en liposomas y Durán et al. (55) en PHBV, con el fin de mejorar la biodisponibilidad para su uso por vía oral y disminuir la citotoxicidad. Takenaga et al. (188) describieron recientemente

su método para sintetizar microesferas lipídicas con rifampicina que liberasen el antibiótico directamente a los macrófagos alveolares *in vivo* e *in vitro*. La rifampicina ha sido microencapsulada en combinación con otros antibióticos en este sentido. Fue microencapsulada en alginato junto con estreptomicina e isoniazida para su uso en nebulizadores en el tratamiento de la tuberculosis (3). Esmaeili et al. (59) encapsularon la rifampicina con isoniazida y pirazinamida en microcápsulas de PLGA (poli-láctico-co-glicólico) obteniendo mejor biodisponibilidad y menor necesidad de dosificación para el tratamiento de la tuberculosis pulmonar. Pandey et al. encapsularon cuatro tuberculostáticos, rifampicina, etambutol, isoniazida y pirazinamida, en nanopartículas de PLGA y estudiaron su eficacia en un modelo murino comprobando que la encapsulación permitía acortar la duración del tratamiento y reducir la frecuencia de dosis en la tuberculosis pulmonar (154).

A pesar de todos los estudios que han utilizado la encapsulación de la rifampicina para su optimizar uso en el tratamiento de la tuberculosis pulmonar, no hemos encontrado en la bibliografía estudios que describan la microencapsulación de la rifampicina para su adición al cemento óseo con el objetivo de preservar las propiedades mecánicas y las características de fraguado del mismo.

Nuestro estudio muestra la posibilidad de microencapsular la rifampicina sin que se afecte de forma importante el fraguado del cemento permitiendo su utilización como espaciador en las infecciones de prótesis articulares. A la vista de los resultados obtenidos en los ensayos de elución y en los ensayos mecánicos, parece un método idóneo para vehiculizar la rifampicina en el cemento óseo.

6.3 Elución en PBS y en cemento óseo

La curva de elución ideal de los antibióticos usados en el cemento óseo ha sido descrita previamente por distintos autores (75, 121, 161). La elución ocurre en tres fases: una fase exponencial en las primeras 24 horas, una fase decreciente y una fase final de elución baja pero constante. La fase exponencial depende el área de difusión, de la superficie de contacto, de la porosidad de la mezcla y de la hidrosolubilidad del antibiótico. Este pico inicial es necesario para cumplir su función antimicrobiana en los momentos de mayor riesgo de colonización protésica. Algunos autores han demostrado la persistencia de niveles eficaces de antibióticos cuatro meses después de su implantación (19, 132).

El perfil de elución observado en este trabajo fue diferente en función del material utilizado para crear las microcápsulas. Las microcápsulas de alginato mostraron la mayor elución y el perfil de elución más rápido de rifampicina en PBS en todos los momentos analizados. Las microcápsulas de etilcelulosa, a pesar de mostrar buenas eluciones a partir de 1 semana, también se descartaron para los siguientes análisis por su baja elución inicial (3.70 µg/ml a las 6 horas) al no cumplir uno de los requisitos fundamentales para su uso en el cemento óseo, que es una alta elución inicial. En nuestro estudio, las microcápsulas de alginato eluyeron más rifampicina que las de PHBV en PBS siendo las diferencias estadísticamente significativas a las 24 y 48h ($p=0.0001$ y $p=0.001$).

Algunos autores estudiaron la elución de microcápsulas con rifampicina en PBS. Durán et al. (55) encapsularon rifampicina en microcápsulas de PHBV para su uso en aerosoles. Estudiaron la cinética de elución de la rifampicina añadiendo 5 mg de micropartículas a 10 ml de PBS con 10% de etanol y determinaron la concentración de

rifampicina mediante espectrofotometría a las 1, 3, 6, 11 y 23 horas. Observaron una liberación inicial alta seguida de una liberación sostenida. Las diferencias observadas entre las tasas de liberación de rifampicina de las distintas muestras estudiadas se debieron a diferencias en el tamaño de las micropartículas. No podemos realizar comparaciones directas con los datos de nuestro estudio debido a las diferentes cantidades en los componentes de las microcápsulas. Además, el ensayo se hizo de diferente manera, nosotros añadimos 5 mg de microcápsulas en 5 ml de PBS y realizamos las mediciones a las 6, 24 y 48 horas y 1 semana. A pesar de esto, la curva de elución sigue la misma tendencia (Figura 34).

Wu et al. (207) crearon microesferas de PLGA y alginato con rifampicina y estudiaron la influencia del tamaño de la cubierta en la cinética de elución de la rifampicina, que en todos los casos mostró un patrón sigmoideo. Observaron que a mayor tamaño de la microesfera, la liberación inicial era menor y la fase sostenida más larga. Sarfaraz et al. (176) prepararon microcápsulas biodegradables de rifampicina mediante emulsificación y gelificación iónica con alginato sódico y Carbopol 974P®. Estudiaron la elución en PBS y ácido ascórbico durante 12 horas, siendo alta inicialmente y mantenida hasta el final del ensayo. La liberación varió según la proporción de alginato sódico y Carbopol® y el tamaño de la microcápsula. En nuestro estudio creamos microcápsulas con alginato solo, siendo la curva de elución similar a la obtenida por Sarfaraz et al., pero no estudiamos la influencia de la cantidad de alginato de la cubierta en la elución de rifampicina.

Aunque no existen referencias en la bibliografía sobre la elución de microcápsulas con antibióticos en cemento óseo, los resultados de la elución de las microcápsulas en PBS se correlacionaron con los de la elución del cemento con microcápsulas en PBS, de forma que las microcápsulas que más rifampicina eluían en

PBS también lo hacían al introducirlas en el cemento. Esto tradujo la capacidad de las microcápsulas para liberar la rifampicina de la microcápsula y del cemento. También indicó la termoestabilidad de la rifampicina, ya que soportó las altas temperaturas que se alcanzan durante la polimerización del cemento.

Cuando el cemento con antibiótico se usa con fines de fijación del implante, lo ideal sería que dejase de eluir el antibiótico varias semanas después de su implantación para disminuir el riesgo de producir resistencias bacterianas (71). En nuestro estudio, las microcápsulas de alginato eluyeron concentraciones de rifampicina elevadas a las 5 semanas, lo cual plantearía un problema en caso de que se quisiera utilizar para la fijación de implantes, no siendo este uno de los objetivos del estudio.

Han et al. (89), a pesar de reconocer que la rifampicina no podía usarse en el cemento óseo para la fabricación de espaciadores, estudió su elución de discos de cemento CMW®3 (Depuy, Warsaw, IN, USA) en PBS los días 1, 3, 7, 14 y 30, utilizando 1g, 2g o 4g de rifampicina por bolsa de 40g de cemento. Detectó rifampicina en el PBS con las muestras que contenían 1g de rifampicina el día 1 ($0.52 \pm 0.18 \mu\text{g/ml}$), hasta el día 14 con 2g ($0.03 \pm 0.00 \mu\text{g/ml}$) y hasta el día 30 con 4g ($1.84 \pm 1.90 \mu\text{g/ml}$). En nuestro trabajo observamos que los discos de cemento CMW®1 con microcápsulas de alginato eluyeron más rifampicina que los discos con rifampicina sin encapsular, siendo las diferencias estadísticamente significativas a las 24h y 48h ($p=0.001$ y $p=0.05$ respectivamente). Además la microencapsulación en alginato supuso la ventaja de una elución más precoz, ya que la rifampicina sin encapsular no comenzó a eluir del cemento hasta las 24h.

Aiken et al. (4) estudiaron la elución y actividad antimicrobiana *in vitro* de la rifampicina pero, en vez de añadirla al PMMA, la agregaron a sulfato cálcico, un

sustituto óseo también empleado en infecciones óseas. Fabricaron cuentas de sulfato cálcico con 600mg de rifampicina por cada 20g de sulfato cálcico. Cuantificaron la cantidad de antibiótico eluída tras introducir las cuentas de sulfato cálcico en PBS a las 4, 8 y 24 h, 2, 7, 14, 28 y 42 días. La concentración pico ocurrió a las 24h y se excedió la CMI para los patógenos que habitualmente causan la infección periprotésica durante los 42 días que duró el ensayo.

6.4 Ensayos mecánicos

Es un hecho conocido que la adición de dosis elevadas de antibióticos al cemento óseo deteriora sus propiedades mecánicas, por eso cuando se utiliza para la fijación de implantes es necesario no sobrepasar las cantidades recomendadas (50, 104, 148). Paz et al. estudiaron el efecto de la adición de cefazolina y vancomicina al cemento Palacos® R+G y observaron que aunque la cefazolina eluía tres veces más que la vancomicina, reducía más la resistencia del cemento (160). La relevancia de esta disminución en las propiedades físicas es menos importante cuando el antibiótico se añade al cemento óseo para ser usado como espaciador, de forma temporal, en el tratamiento de la infección periprotésica (131). Son necesarios entre un 5-10%P/P de antibiótico para obtener buenos niveles de elución de antibiótico del cemento óseo y así conseguir niveles locales terapéuticos, de hecho, para la fabricación de espaciadores se utilizan 6-8g por 40g de cemento. He et al. estudiaron las modificaciones mecánicas tras añadir 1g (2.4%P/P), 2g (4.8%P/P), 4g (9.1%P/P), y 6g (13%P/P), de gentamicina al cemento Palacos®, recomendando un máximo de 6.5%P/P de antibiótico para mantener las propiedades de compresión del cemento (94). Lautenschlager et al. estimaron que la adición de 4.5g de gentamicina por 40g de cemento (10.1%P/P) disminuía la fuerza de compresión por debajo de 70 MPa (118).

De Palma, en 1982, fue el primero en hacer referencia a la inhibición de la polimerización completa del cemento óseo CMW® cuando se añadía rifampicina (49). Anguita-Alonso (8) y Gálvez-López (71) más recientemente, reconocen los beneficios que supondría en el tratamiento de la infección periprotésica el conseguir un cemento que liberase rifampicina, pero señalan el mismo problema en cuanto al retraso del fraguado.

No hemos encontrado en la bibliografía ninguna publicación en la que se muestre alguna solución al problema de la inhibición de la polimerización del cemento al añadir rifampicina. Los estudios que han informado de esta limitación considerándolo no apto para su uso en el cemento óseo se resumen en la Tabla 60.

Estudio	Tipo de cemento	Cantidad de antibiótico	Método	Resultados	Conclusiones
Anguita-Alonso (8)	Simplex P (Stryker, Mahwah, NJ)	2.5%, 7.5%, 15%	Micrococcus luteus ATCC 9341	$5\pm 2/147\pm 15/409\pm 46$ $\mu\text{g/ml/h}$ de AUC, $4\pm 1/15\pm 2/31\pm 11$ $\mu\text{g/ml}$ de concentración pico	La rifampicina puede ser adecuada para el manejo de las infecciones en ortopedia
Beeching (16)	CMW1 (Depuy, Blackpool, UK)	2.5%	S.aureus ATCC 25923, E.coli ATCC 25922	No documentado	No endurece durante varios días
De Palma (49)	CMW (Depuy, Blackpool, UK)	1.2g/40g	Test de dureza	No documentado	La combinación de rifampicina con CMW evita la completa polimerización
Han (89)	CMW3 (Depuy, Blackpool, UK)	1g/2g/4g	Resistencia a compresión, actividad antimicrobiana	Resistencia no se pudo medir, eficacia antibacteriana parcial	Se evitó la polimerización

Tabla 60. Estudios publicados que indican que la rifampicina afecta a la polimerización del PMMA

Al igual que los trabajos mencionados, nuestros ensayos mecánicos demuestran que la adición de rifampicina sin encapsular al cemento óseo produce un deterioro de sus propiedades mecánicas. Las diferencias observadas en la fuerza máxima, resistencia y módulos de flexión entre el cemento control y el cemento con rifampicina sin

encapsular fueron estadísticamente significativas ($p=0.031$, $p=0.003$ y $p=0.027$ respectivamente).

La resistencia a la compresión se redujo un 14% respecto al cemento control (CMW®1 sin antibiótico) con la rifampicina microencapsulada con PHBV y alginato y un 30% con la rifampicina sin encapsular. En cuanto a la resistencia a la flexión, ésta se redujo un 9.5% respecto al cemento control con la rifampicina microencapsulada con PHBV y un 16% con la rifampicina sin encapsular. En este ensayo las microcápsulas de alginato mostraron peores resultados, con una reducción del 18% de la resistencia a la flexión respecto al cemento control. Esto se debe a que las microcápsulas de alginato son más grandes que el resto de las microcápsulas estudiadas y la propia microcápsula rompió la probeta de cemento (comparable a la rotura por una burbuja) por lo que la resistencia a la flexión se vio disminuida.

Las determinaciones de dureza a los 15 min, 30 min, 45 min, 1 h, 2h, 3h, 4h y 24 h se llevaron a cabo partiendo de la premisa, que se cumplió, de que la adición tanto de rifampicina sin encapsular como de microcápsulas podía no afectar de forma muy relevante a la resistencia a flexión a largo plazo del cemento (tras una semana de fraguado), pero sí que podía ralentizar este proceso de fraguado de forma que en periodos de tiempo más cortos se apreciaran diferencias importantes en la resistencia del cemento.

Nuestro estudio mostró que la microencapsulación de la rifampicina consigue un menor deterioro en la resistencia a la flexión, a la compresión y en la dureza y tiempo de fraguado, persistiendo dentro de los límites adecuados para la fabricación de espaciadores, aunque no existen suficientes datos que avalen la seguridad en la fijación primaria de los implantes.

Observamos que la adición de rifampicina sin encapsular al cemento modificó sus propiedades de dureza debido a la inhibición de la polimerización ya descrita (8, 89, 138). 45 minutos después de su mezclado, adquirió una dureza apta para su uso como espaciador, pero esta demora imposibilita su uso como espaciador de cemento en la práctica clínica.

La microencapsulación de la rifampicina con alginato permitió que el cemento adquiriese propiedades de dureza comparables a las del cemento control (sin antibiótico) ($p=0.123$). Las microcápsulas de PHBV también proporcionaron este efecto, pero en un tiempo mayor (a las 2 horas de la mezcla). Esto demuestra que la microencapsulación impide que la rifampicina reaccione con el peróxido de benzoilo y/o con la DmpT y que se oxide. De esta forma, los iniciadores pueden reaccionar con el PMMA y no se inhibe la reacción de polimerización, consiguiéndose un cemento que fragua en los mismos tiempos que el cemento control, hecho no conseguido ni siquiera con los antibióticos habitualmente utilizados en el cemento óseo.

Con el fin de mejorar las propiedades mecánicas del cemento óseo, se ha estudiado la adición de partículas de hidroxapatita (HA) al PMMA. Serbetci et al. plantearon que la incorporación de hasta un 8% de HA incrementaba la resistencia a la compresión (178). Otros estudios mostraron que hasta un 12.5% en peso de HA podía ser añadido al cemento óseo Simplex® P para mejorar sus propiedades mecánicas (34). Sin embargo, no hemos encontrado trabajos en la bibliografía que hayan estudiado la adición de HA u otros métodos para mejorar las propiedades mecánicas cuando se usan antibióticos. Tampoco hay estudios en la bibliografía que hayan intentado preservar las propiedades de dureza “basales” del cemento óseo con antibióticos mediante el método de microencapsulación.

6.5 Ensayos microbiológicos

La microencapsulación de la rifampicina no modifica sus propiedades microbiológicas. Durán et al. (55) encapsularon la rifampicina en micropartículas de PHBV para su uso por vía inhalatoria en infecciones respiratorias. Compararon la actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538®, por el método de difusión en agar, tras introducir 100 ml de micropartículas con rifampicina (4 mg/ml) y 100 ml de rifampicina sola en una cavidad creada en el agar. Concluyeron que la microencapsulación inhibía el crecimiento de *S.aureus* de forma similar a la rifampicina sin encapsular, a las 20 y 24h de incubación. En nuestro estudio no hicimos ensayos microbiológicos con las microcápsulas en agar.

Los estudios de difusión en agar se realizaron directamente con las muestras de cemento por lo que no se pudieron comparar los resultados con los datos publicados en la bibliografía, realizados con discos de papel impregnados en el líquido resultante de la elución de las muestras de cemento. En este sentido, a partir de los diámetros de los halos de inhibición observados con discos de papel con unas cargas definidas de antibiótico es posible, consultando los documentos CLSI (Clinical&Laboratory Standards Institute) (201), conocer los puntos de corte equivalentes a las concentraciones mínimas inhibitorias de antibióticos y determinar si el microorganismo es sensible, intermedio o resistente al antibiótico estudiado, no siendo éste uno de los objetivos del estudio.

Aiken et al. (4) valoraron la preservación de la actividad antimicrobiana de la rifampicina tras ser añadida al sulfato cálcico para formar cuentas mediante el test de difusión en disco de Kirby-Bauer, con *S.aureus* ATCC 6538® y *S.epidermidis* ATCC 12228®. La aparición de zonas de inhibición de crecimiento bacteriano alrededor de las

cuentas puso de manifiesto su utilidad como vector para liberar este antibiótico en el tratamiento de las infecciones óseas.

El estudio de Beeching et al. (16) es el único que valoró la actividad in vitro de antibióticos incorporados directamente al cemento óseo (sin usar discos de difusión). Utilizaron placas inoculadas con *S.aureus* ATCC 25923® y discos fabricados con cemento CMW®1 (Depuy, Blackpool, UK) cargados con diferentes antibióticos, entre ellos rifampicina. Emplearon placas de agar sangre sembradas con *Staphylococcus aureus* ATCC 25923® tras diluirlo a una concentración de 0.5 de Mac Farland. Colocaron los discos de cemento (1mm de espesor y 20mm de diámetro) en el centro de cada placa y los incubaron en medio aerobio a 37°C, transfiriendo los discos de cemento a nuevas placas diaria y semanalmente según un programa preestablecido. Calcularon el radio anular de inhibición y el diámetro medio total del halo de inhibición en mm (restándole los 20 mm que medía el disco y dividiéndolo entre 2). Hacen referencia a que la rifampicina producía un material negro pastoso que no se endurecía hasta varios días después, produciendo un radio anular de inhibición tras una noche de incubación de 9 mm. Los diámetros medios de los halos de inhibición en nuestro estudio con las muestras de cemento con rifampicina sin encapsular, con microcápsulas de alginato y de PHBV fue 9.33, 20.77 y 4.88 mm respectivamente. No se pudieron llevar a cabo comparaciones válidas dado que las probetas de cemento no eran del mismo tamaño, no se trataba de la misma cepa de *S.aureus* y en el estudio de Beeching no concretaron la cantidad de rifampicina añadida al cemento.

Obtener datos concretos de la sensibilidad del *S.aureus* a la rifampicina no era el objetivo principal de nuestros ensayos microbiológicos sino más bien, comprobar que la rifampicina era capaz de eluir de las microcápsulas de alginato o de PHBV y a continuación del cemento óseo, conservando sus propiedades antimicrobianas contra

S.aureus. La presencia de halos de inhibición alrededor de las muestras de cemento con microcápsulas de rifampicina demuestra la consecución de este objetivo.

6.6 Aplicación clínica del cemento con rifampicina

La principal utilidad que se deriva de este estudio experimental es la posibilidad de obtener un cemento óseo que contenga y eluya rifampicina y que muestre unas propiedades mecánicas válidas para la fabricación de espaciadores de cemento en el tratamiento de las infecciones protésicas.

La rápida emergencia de cepas resistentes es un problema importante durante el uso de rifampicina en monoterapia (70). Este trabajo no pretende su uso como antibiótico único en los espaciadores de cemento, en la práctica clínica debería combinarse con otros antibióticos para evitar el problema de las resistencias. La intención de este estudio fue diseñar un método experimental que permitiese obtener un cemento óseo con rifampicina.

La utilización de rifampicina localmente en el tratamiento de las infecciones de prótesis articulares supone una oportunidad más en su tratamiento. La concentración de rifampicina que se alcanzaría en el tejido periprotésico con un espaciador que liberase este antibiótico localmente sería inalcanzable con su administración por vía sistémica, teniendo en cuenta que la toxicidad y los efectos secundarios limitan su dosificación. La intolerancia gastrointestinal puede ser excesivamente grave y se ha descrito la aparición de una hepatitis dosis-dependiente, en ocasiones fulminante.

Tras la retirada de los implantes protésicos y el desbridamiento exhaustivo de los tejidos periprotésicos, sobreviven en los tejidos bacterias en fase estacionaria. Pocos antibióticos son eficaces frente a estas bacterias del biofilm, que han modificado su expresión genética para entrar en una fase latente (150). Aquí es donde la rifampicina liberada por el espaciador de cemento jugaría su papel más importante, ya que ha

mostrado excelente actividad frente a los estafilococos que están en fase estacionaria en el biofilm (78, 117, 157, 204).

A pesar de sus conocidas ventajas en el tratamiento de la infección periprotésica, hasta el momento no había sido posible la adición de rifampicina al cemento óseo por la interferencia que produce en la polimerización del PMMA, dando lugar a un material de consistencia inapropiada para la fabricación de espaciadores. Los estudios previamente publicados no han profundizado en el análisis de mecanismos alternativos para incluir la rifampicina en el cemento óseo sin que se alteren sus propiedades mecánicas (71).

A la vista de los resultados de este trabajo, los beneficios de conseguir concentraciones locales elevadas de rifampicina en el lugar de la infección periprotésica son indudables, y la mejor opción de microencapsulación de la rifampicina sería la gelificación iónica con alginato, por su capacidad de elución y sus características mecánicas adecuadas.

6.7 El futuro del cemento con antibióticos

La liberación de antibióticos por parte del cemento óseo y las modificaciones en las propiedades mecánicas que derivan de esta mezcla, son características ampliamente estudiadas, como se desprende de la bibliografía aportada en este trabajo.

El desarrollo de mecanismos de resistencia a antibióticos por las bacterias que causan infecciones protésicas ha dejado de ser una previsión para el futuro y es ya una realidad. Colling et al. (43) publicaron en 2015 que el 24% de las infecciones periprotésicas eran causadas por MRSA. Los aminoglucósidos, aunque son los antibióticos que más frecuentemente se usan en el cemento óseo, han demostrado escasas resistencias (172). Pero la preocupación por el esperable aumento de estas resistencias y por la creciente complejidad del tratamiento de las infecciones protésicas ha suscitado el interés por el estudio de otros antibióticos que puedan mezclarse con el cemento óseo, como es el caso de la rifampicina (138).

Varios autores han señalado que el uso de rifampicina en combinación con otros antibióticos por vía sistémica proporciona buenos resultados en las infecciones de prótesis articulares (111, 147). En un ensayo clínico aleatorizado y doble-ciego, Zimmerli et al. mostraron mayor tasa de curación en pacientes tratados con ciprofloxacino y rifampicina (100%) frente a ciprofloxacino y placebo (58%), sin retirar los implantes protésicos (211). En consecuencia, si se consiguieran niveles locales de rifampicina superiores a los alcanzados con su administración sistémica aumentarían de forma considerable las probabilidades de éxito en el tratamiento de la infección periprotésica. De ahí el ferviente interés por conseguir un cemento óseo que permita fabricar un espaciador que eluya grandes cantidades de rifampicina.

Por otra parte, los ensayos realizados en este trabajo con la adición de microcápsulas al PMMA pueden ser el punto de partida para estudiar si la microencapsulación aportaría ventajas en el caso de antibióticos que actualmente son de uso común en el cemento óseo, ya que como se desprende de los resultados obtenidos con la rifampicina, las propiedades mecánicas del PMMA se mantendrían casi indemnes.

Siguiendo la misma línea de este estudio, la encapsulación podría suponer una ventaja en otros antibióticos cuya adición al cemento óseo plantea inconvenientes. Tal es el caso de la anfotericina, que como describieron Goss et al. (82) no eluye en dosis clínicamente relevantes del cemento óseo, y sería una opción terapéutica interesante en el tratamiento de las infecciones periprotésicas fúngicas. Algunos antibióticos que podrían ser útiles en el tratamiento de ciertas infecciones periprotésicas, como cefalosporinas de segunda y tercera generación, eritromicina, meropenem o tetraciclina, son termosensibles y se ha demostrado que disminuyen su actividad antimicrobiana hasta 16 veces tras someterlos a autoclave a 121°C durante 15 minutos (195). La microencapsulación, al aislar el antibiótico durante el proceso de polimerización del PMMA, podría ser interesante para mejorar estabilidad y la elución de algunos antibióticos termosensibles.

Asimismo la microencapsulación podría extenderse a otros campos de la cirugía ortopédica como la cirugía oncológica. En este sentido ya se ha empleado el cemento óseo para vehiculizar agentes antitumorales en metástasis óseas. Katagiri et al. utilizaron PMMA con adriamicina tras la resección y curetaje de 27 metástasis óseas de cáncer de pulmón (109). Aunque se necesitan más investigaciones, la microencapsulación de fármacos antitumorales parece que podría ser una opción en esta

línea terapéutica al mejorar, hipotéticamente, su liberación local conservando las propiedades del PMMA.

6.8 Limitaciones del estudio

Todos los trabajos publicados hasta el momento se limitan a considerar la rifampicina como un antibiótico no apto para su uso en el cemento óseo, sin aportar soluciones al problema de la polimerización del PMMA. Este es el primer ensayo en el que se describe un método que permite obtener un cemento cargado con altas dosis de rifampicina conservando unas propiedades mecánicas que le hacen apropiado para la fabricación de espaciadores de cemento en las infecciones protésicas. Sin embargo, la principal limitación es su naturaleza *in vitro* que puede no reflejar con exactitud las condiciones *in vivo*. Se necesitarían ensayos en animales para conocer mejor los efectos del cemento con rifampicina en la infección protésica.

Existieron errores metodológicos al estudiar las características de microencapsulación de las microcápsulas de alginato. Se asumió inicialmente que esta sustancia se disolvería con metanol y diclorometano, no siendo así, lo que llevó a utilizar el EDTA para la disolución de la cubierta con el fin de valorar la rifampicina contenida en la microcápsula. En los ensayos iniciales no se pudo calcular el rendimiento de las microcápsulas de alginato.

Otra limitación es el pequeño tamaño muestral. No obstante, en otras publicaciones el número de muestras estudiadas fue similar. Bridgens et al. emplearon dos muestras para estudiar la elución y resistencia mecánica de distintos antibióticos añadidos al PMMA (29).

No se estudió el sinergismo de la rifampicina con otros antibióticos habitualmente utilizados en el cemento óseo para la fabricación de espaciadores, como la gentamicina o la vancomicina. La monoterapia aumenta el riesgo de desarrollar resistencias por lo que no se recomienda. La combinación de antibióticos podría incluso

mejorar las propiedades de elución como se ha demostrado en el caso del Copal® (58) y en otras combinaciones como vancomicina e imipenem (35). No obstante, los autores no creen que esto afecte a la validación externa de los resultados puesto que éste no era el objetivo inicial del trabajo, y la adición de otro antibiótico al PMMA podría incluso aumentar la elución del primer antibiótico (rifampicina). La adición de un segundo antibiótico podría disminuir las propiedades mecánicas tal como describieron Sanz et al. (175), por lo que es necesario ampliar el estudio en este sentido antes de recomendar su uso clínico.

CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

- 1) Técnicamente es posible microencapsular rifampicina con alginato, PHBV, ácido esteárico y etilcelulosa. De la interpretación conjunta de los ensayos de microencapsulación, ensayos de elución y ensayos mecánicos, se concluye que el alginato es el polímero que aporta más ventajas para microencapsular la rifampicina.
- 2) Es posible la adición de microcápsulas de PHBV y alginato con rifampicina al cemento óseo. Ni éstas ni la rifampicina contenida sufren modificaciones en sus características fisicoquímicas debido a las altas temperaturas alcanzadas durante la polimerización.
- 3) La microencapsulación de la rifampicina con alginato permite la completa polimerización del cemento óseo en tiempos comparables a los del cemento control (cemento sin antibiótico). Los ensayos mecánicos muestran que el cemento con microcápsulas de alginato y PHBV mantienen propiedades de resistencia adecuadas para su uso clínico, persistiendo valores superiores a los exigidos en las distintas normativas internacionales.
- 4) La rifampicina es capaz de eluir de las microcápsulas al PBS, detectándose diferentes concentraciones de rifampicina en función del polímero empleado para sintetizar las microcápsulas, siendo más favorable la elución desde las microcápsulas de alginato y PHBV. La rifampicina es capaz de eluir de las microcápsulas y del cemento óseo al PBS, siendo más favorable la elución desde las microcápsulas de alginato que de PHBV.
- 5) El cemento con microcápsulas de alginato tiene mayor efecto antimicrobiano sobre *Staphylococcus aureus* que el cemento con rifampicina sin encapsular y con microcápsulas de PHBV. Por lo tanto, la técnica de microencapsulación de rifampicina con alginato es un método útil para añadirla al cemento óseo, y hace posible su uso en espaciadores de cemento en infecciones periprotésicas.

BIBLIOGRAFÍA

8. BIBLIOGRAFÍA

1. American Academy of Orthopaedic Surgeons. Recommendations for the use of intravenous antibiotic prophylaxis in primary total joint arthroplasty. 2004.
2. American Academy of Orthopaedic Surgeons. The use of prophylactic antibiotics in orthopaedic medicine and the emergence of vancomycin-resistant bacteria. 1998.
3. Ahmad Z, Sharma S, Khuller GK. Inhalable alginate nanoparticles as antitubercular drug carriers against experimental tuberculosis. *Int J Antimicrob Agents*. 2005;26(4):298-303.
4. Aiken SS, Cooper JJ, Florance H, Robinson MT, Michell S. Local release of antibiotics for surgical site infection management using high-purity calcium sulfate: an in vitro elution study. *Surg infect*. 2015;16(1):54-61.
5. Anagnostakos K, Kelm J. Enhancement of antibiotic elution from acrylic bone cement. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2009;90(1):467-75.
6. Anderson JA, Sculco PK, Heitkemper S, Mayman DJ, Bostrom MP, Sculco TP. An articulating spacer to treat and mobilize patients with infected total knee arthroplasty. *J Arthroplasty*. 2009;24(4):631-5.
7. Andersson M, Nordstierna L, Bergek J, Blanck H, Holmberg K, Nyden M. Use of microcapsules as controlled release devices for coatings. *Adv Colloid Interface Sci*. 2015;222:18-43.
8. Anguita-Alonso P, Rouse MS, Piper KE, Jacofsky DJ, Osmon DR, Patel R. Comparative study of antimicrobial release kinetics from polymethylmethacrylate. *Clin Orthop Relat Res*. 2006;445:239-44.
9. Ariza J, Euba G, Murillo O. Orthopedic device-related infections. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2008;26(6):380-90.
10. Atienza J, Barrientos J, Muñoz A, Vaquero J. El uso del cemento óseo (Polimetilmetacrilato) en la fijación de las artroplastias. Estudio experimental. *Rev Ortop Traumatol*. 1986;6(30):611-31.
11. Baker CN, Thornsberry C, Hawkinson RW. Inoculum standardization in antimicrobial susceptibility testing: evaluation of overnight agar cultures and the rapid inoculum standardization system. *J Clin Microbiol*. 1983;17(3):450-7.
12. Balaban N, Stoodley P, Fux CA, Wilson S, Costerton JW, Dell'Acqua G. Prevention of staphylococcal biofilm-associated infections by the quorum sensing inhibitor RIP. *Clin Orthop Relat Res*. 2005(437):48-54.

13. Baleani M, Persson C, Zolezzi C, Andollina A, Borrelli AM, Tigani D. Biological and biomechanical effects of vancomycin and meropenem in acrylic bone cement. *J Arthroplasty*. 2008;23(8):1232-8.
14. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol*. 1966;45(4):493-6.
15. Bauer TW, Parvizi J, Kobayashi N, Krebs V. Diagnosis of periprosthetic infection. *J Bone Joint Surg Am*. 2006;88(4):869-82.
16. Beeching NJ, Thomas MG, Roberts S, Lang SD. Comparative in-vitro activity of antibiotics incorporated in acrylic bone cement. *J Antimicrob Chemoter*. 1986;17(2):173-84.
17. Beenken KE, Bradney L, Bellamy W, Skinner RA, McLaren SG, Gruenwald MJ, et al. Use of xylitol to enhance the therapeutic efficacy of polymethylmethacrylate-based antibiotic therapy in treatment of chronic osteomyelitis. *Antimicrob Agents Chemoter*. 2012;56(11):5839-44.
18. Belkoff SM, Sanders JC, Jasper LE. The effect of the monomer-to-powder ratio on the material properties of acrylic bone cement. *J Biomed Mater Res*. 2002;63(4):396-9.
19. Bertazzoni Minelli E, Benini A, Magnan B, Bartolozzi P. Release of gentamicin and vancomycin from temporary human hip spacers in two-stage revision of infected arthroplasty. *J Antimicrob Chemoter*. 2004;53(2):329-34.
20. Beyger JW, Nairn JG. Some factors affecting the microencapsulation of pharmaceuticals with cellulose acetate phthalate. *J Pharm Sci*. 1986;75(6):573-8.
21. Biehl G, Harms J, Hanser U. Experimental studies on heat development in bone during polymerization of bone cement. Intraoperative measurement of temperature in normal blood circulation and in bloodlessness. *Arch Orthop Unfallchir*. 1974;78(1):62-9.
22. Bloomfield MR, Klika AK, Barsoum WK. Antibiotic-coated spacers for total hip arthroplasty infection. *Orthopedics*. 2010;33(9):649.
23. Booth RE, Jr., Lotke PA. The results of spacer block technique in revision of infected total knee arthroplasty. *Clin Orthop Relat Res*. 1989(248):57-60.
24. Bottner F, Wegner A, Winkelmann W, Becker K, Erren M, Gotze C. Interleukin-6, procalcitonin and TNF-alpha: markers of peri-prosthetic infection following total joint replacement. *J Bone Joint Surg Br*. 2007;89(1):94-9.
25. Bozic KJ, Kurtz SM, Lau E, Ong K, Chiu V, Vail TP, et al. The epidemiology of revision total knee arthroplasty in the United States. *Clin Orthop Relat Res*. 2010;468(1):45-51.

26. Bradbury T, Fehring TK, Taunton M, Hanssen A, Azzam K, Parvizi J, et al. The fate of acute methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* periprosthetic knee infections treated by open debridement and retention of components. *J Arthroplasty*. 2009;24(6 Suppl):101-4.
27. Breusch S, Malchau H, Kühn KD. Properties of bone cement: what is bone cement. In: Breusch S, Malchau H, eds. *The well-cemented total hip arthroplasty*. Heidelberg: Springer Medizin Verlag, 2005:52–9.
28. Breusch SJ, Kühn KD. Bone cements based on polymethylmethacrylate. *Orthopade*. 2003;32(1):41-50.
29. Bridgens J, Davies S, Tilley L, Norman P, Stockley I. Orthopaedic bone cement: do we know what we are using? *J Bone Joint Surg Br*. 2008;90(5):643-7.
30. Britton G. UV/visible spectroscopy. *ChemInform*. 1995;26(32).
31. Buchholz HW, Engelbrecht H. Depot effects of various antibiotics mixed with Palacos resins. *Chirurg*. 1970;41(11):511-5.
32. Burnett RS, Aggarwal A, Givens SA, McClure JT, Morgan PM, Barrack RL. Prophylactic antibiotics do not affect cultures in the treatment of an infected TKA: a prospective trial. *Clin Orthop Relat Res*. 2010;468(1):127-34.
33. Callaghan JJ, Katz RP, Johnston RC. One-stage revision surgery of the infected hip. A minimum 10-year followup study. *Clin Orthop Relat Res*. 1999(369):139-43.
34. Castaldini A CA. Creep Behaviour of Composite Bone Cements. In: Christel P MA, Lee AJC, editor. *Biological and biomedical performance of biomaterials*. Amsterdam: Elsevier Science Publisher; 1986. p. 525-30.
35. Cerretani D, Giorgi G, Fornara P, Bocchi L, Neri L, Ceffa R, et al. The in vitro elution characteristics of vancomycin combined with imipenem-cilastatin in acrylic bone-cements: a pharmacokinetic study. *J Arthroplasty*. 2002;17(5):619-26.
36. Charnley J. *Acrylic Cement in Orthopaedic Surgery*.: The Williams & Wilkins Company, Baltimore; 1970.
37. Charnley J. Anchorage of the femoral head prosthesis to the shaft of the femur. *J Bone Joint Surg Br*. 1960;42-B:28-30.
38. Charnley J. Arthroplasty of the hip. A new operation. *Lancet*. 1961;1(7187):1129-32.
39. Charnley J. The bonding of prostheses to bone by cement. *J Bone Joint Surg Br*. 1964;46:518-29.
40. Charnley J. The reaction of bone to self-curing acrylic cement. A long-term histological study in man. *J Bone Joint Surg Br*. 1970;52(2):340-53.

41. Chung PY, Toh YS. Anti-biofilm agents: recent breakthrough against multi-drug resistant *Staphylococcus aureus*. *Pathog Dis*. 2014;70(3):231-9.
42. Cohen JC, Hozack WJ, Cuckler JM, Booth RE, Jr. Two-stage reimplantation of septic total knee arthroplasty. Report of three cases using an antibiotic-PMMA spacer block. *J Arthroplasty*. 1988;3(4):369-77.
43. Colling K, Statz C, Glover J, Banton K, Beilman G. Pre-operative antiseptic shower and bath policy decreases the rate of *S. aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* surgical site infections in patients undergoing joint arthroplasty. *Surg Infect*. 2015;16(2):124-32.
44. Costerton JW. Overview of microbial biofilms. *J Ind Microbiol*. 1995;15(3):137-40.
45. Crowninshield R. Femoral hip implant fixation within bone cement. *Operative Techniques in Orthopaedics*. 2001;11:296-9.
46. Cucarella C, Solano C, Valle J, Amorena B, Lasa I, Penades JR. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J Bacteriol*. 2001;183(9):2888-96.
47. Cui Q, Mihalko WM, Shields JS, Ries M, Saleh KJ. Antibiotic-impregnated cement spacers for the treatment of infection associated with total hip or knee arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am*. 2007;89(4):871-82.
48. Darouiche RO. Device-associated infections: a macroproblem that starts with microadherence. *Clin Infect Dis*. 2001;33(9):1567-72.
49. De Palma L, Greco F, Ciarpaglini C, Caneva C. The mechanical properties of "cement-antibiotic" mixtures. *Ital J Orthop Traumatol*. 1982;8(4):461-7.
50. DeLuise M, Scott CP. Addition of hand-blended generic tobramycin in bone cement: effect on mechanical strength. *Orthopedics*. 2004;27(12):1289-91.
51. Di Cesare PE, Chang E, Preston CF, Liu CJ. Serum interleukin-6 as a marker of periprosthetic infection following total hip and knee arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am*. 2005;87(9):1921-7.
52. Drancourt M, Stein A, Argenson JN, Zannier A, Curvale G, Raoult D. Oral rifampin plus ofloxacin for treatment of *Staphylococcus*-infected orthopedic implants. *Antimicrob Agents Chemother*. 1993;37(6):1214-8.
53. Dunne N, Hill J, McAfee P, Todd K, Kirkpatrick R, Tunney M, et al. In vitro study of the efficacy of acrylic bone cement loaded with supplementary amounts of gentamicin: effect on mechanical properties, antibiotic release, and biofilm formation. *Acta Orthop*. 2007;78(6):774-85.
54. Dunne NJ, Orr JF. Curing characteristics of acrylic bone cement. *J Mater Sci Mater Med*. 2002;13(1):17-22.

55. Duran N, Alvarenga MA, Da Silva EC, Melo PS, Marcato PD. Microencapsulation of antibiotic rifampicin in poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate). *Arch Pharm Res.* 2008;31(11):1509-16.
56. Egle H, Trittler R, Kummerer K, Lemmen SW. Linezolid and rifampin: Drug interaction contrary to expectations? *Clin Pharmacol Ther.* 2005;77(5):451-3.
57. Elson RA. Exchange arthroplasty for infection. Perspectives from the United Kingdom. *Orthop Clin North Am.* 1993;24(4):761-7.
58. Ensing GT, van Horn JR, van der Mei HC, Busscher HJ, Neut D. Copal bone cement is more effective in preventing biofilm formation than Palacos R-G. *Clin Orthop Relat Res.* 2008;466(6):1492-8.
59. Esmaili F, Hosseini-Nasr M, Rad-Malekshahi M, Samadi N, Atyabi F, Dinarvand R. Preparation and antibacterial activity evaluation of rifampicin-loaded poly lactide-co-glycolide nanoparticles. *Nanomedicine.* 2007;3(2):161-7.
60. Espehaug B, Engesaeter LB, Vollset SE, Havelin LI, Langeland N. Antibiotic prophylaxis in total hip arthroplasty. Review of 10,905 primary cemented total hip replacements reported to the Norwegian arthroplasty register, 1987 to 1995. *J Bone Joint Surg Br.* 1997;79(4):590-5.
61. Fink B, Grossmann A, Fuerst M, Schafer P, Frommelt L. Two-stage cementless revision of infected hip endoprostheses. *Clin Orthop Relat Res.* 2009;467(7):1848-58.
62. Finkelstein R, Rabino G, Mashiah T, Bar-El Y, Adler Z, Kertzman V, et al. Vancomycin versus cefazolin prophylaxis for cardiac surgery in the setting of a high prevalence of methicillin-resistant staphylococcal infections. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2002;123(2):326-32.
63. Fitzgerald RH, Jr. Infected Total Hip Arthroplasty: Diagnosis and Treatment. *The J Am Acad Orthop Surg.* 1995;3(5):249-62.
64. Flórez J. MA. Farmacología de las infecciones por micobacterias. *Farmacología humana: Masson;* 1997. p. 1163-4.
65. Forrest GN, Tamura K. Rifampin combination therapy for nonmycobacterial infections. *Clin Microbiol Rev.* 2010;23(1):14-34.
66. Francois P, Vaudaux P, Lew PD. Role of plasma and extracellular matrix proteins in the physiopathology of foreign body infections. *Anns Vasc Surg.* 1998;12(1):34-40.
67. Frank D, Cseh G, Kocsis B, Nagy T, Borsiczky B, Tokes-Fuzesi M, et al. Polymethyl-methacrylate-sorbitol-based capsules as local drug delivery vehicles: an in vitro antibiotic elution study. *Cell Biol Int.* 2011;35(3):267-72.

68. Frommelt L, Kühn K-D. Properties of bone cement: Antibiotic-loaded cement. In: Breusch S, Malchau H, editors. *The well-cemented total hip arthroplasty*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2005. p. 86-92.
69. Frutos Cabanillas P, Diez Pena E, Barrales-Rienda JM, Frutos G. Validation and in vitro characterization of antibiotic-loaded bone cement release. *Int J Pharm*. 2000;209(1-2):15-26.
70. Gallo GG RP. Rifampicin. In: K F, editor. *Analytical profiles of drug substances*. 5. New York, NY: Academic press; 1976. p. 467-575.
71. Galvez-Lopez R, Pena-Monje A, Antelo-Lorenzo R, Guardia-Olmedo J, Moliz J, Hernandez-Quero J, et al. Elution kinetics, antimicrobial activity, and mechanical properties of 11 different antibiotic loaded acrylic bone cement. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2014;78(1):70-4.
72. Garcia S, Soriano A, Esteban P, Almela M, Gallart X, Mensa J. Usefulness of adding antibiotic to cement in one stage exchange of chronic infection in total hip arthroplasty. *Med Clin*. 2005;125(4):138-9.
73. Garvin KL, Fitzgerald RH, Jr., Salvati EA, Brause BD, Nercessian OA, Wallrichs SL, et al. Reconstruction of the infected total hip and knee arthroplasty with gentamicin-impregnated Palacos bone cement. *Instr Course Lect*. 1993;42:293-302.
74. Garvin KL, Konigsberg BS. Infection following total knee arthroplasty: prevention and management. *Instr Course Lect*. 2012;61:411-9.
75. Gasparini G, De Gori M, Calonego G, Della Bora T, Caroleo B, Galasso O. Drug elution from high-dose antibiotic-loaded acrylic cement: a comparative, in vitro study. *Orthopedics*. 2014;37(11):e999-1005.
76. Ghanem E, Parvizi J, Burnett RS, Sharkey PF, Keshavarzi N, Aggarwal A, et al. Cell count and differential of aspirated fluid in the diagnosis of infection at the site of total knee arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am*. 2008;90(8):1637-43.
77. Ginebra MP, Albuixech L, Fernandez-Barragan E, Aparicio C, Gil FJ, San RJ, et al. Mechanical performance of acrylic bone cements containing different radiopacifying agents. *Biomaterials*. 2002;23(8):1873-82.
78. Giulieri SG, Graber P, Ochsner PE, Zimmerli W. Management of infection associated with total hip arthroplasty according to a treatment algorithm. *Infection*. 2004;32(4):222-8.
79. Goksan SB, Freeman MA. One-stage reimplantation for infected total knee arthroplasty. *J Bone Joint Surg Br*. 1992;74(1):78-82.
80. Goldberg M, Langer R, Jia X. Nanostructured materials for applications in drug delivery and tissue engineering. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2007;18(3):241-68.

81. Gooding CR, Masri BA, Duncan CP, Greidanus NV, Garbuz DS. Durable infection control and function with the Prostalac spacer in two-stage revision for infected knee arthroplasty. *Clin Orthop Relat Res.* 2011;469(4):985-93.
82. Goss B, Lutton C, Weinrauch P, Jabur M, Gillett G, Crawford R. Elution and mechanical properties of antifungal bone cement. *J Arthroplasty.* 2007;22(6):902-8.
83. Greidanus NV, Masri BA, Garbuz DS, Wilson SD, McAlinden MG, Xu M, et al. Use of erythrocyte sedimentation rate and C-reactive protein level to diagnose infection before revision total knee arthroplasty. A prospective evaluation. *J Bone Joint Surg Am.* 2007;89(7):1409-16.
84. Gristina AG. Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration. *Science.* 1987;237(4822):1588-95.
85. Haas SS, Brauer GM, Dickson G. A characterization of polymethylmethacrylate bone cement. *J Bone Joint Surg Am.* 1975;57(3):380-91.
86. Haboush EJ. A new operation for arthroplasty of the hip based on biomechanics, photoelasticity, fast-setting dental acrylic, and other considerations. *Bull Hosp Joint Dis.* 1953;14(2):242-77.
87. Hacek DM, Robb WJ, Paule SM, Kudrna JC, Stamos VP, Peterson LR. *Staphylococcus aureus* nasal decolonization in joint replacement surgery reduces infection. *Clin Orthop Relat Res.* 2008;466(6):1349-55.
88. Haddad FS, Muirhead-Allwood SK, Manktelow AR, Bacarese-Hamilton I. Two-stage uncemented revision hip arthroplasty for infection. *J Bone Joint Surg Br.* 2000;82(5):689-94.
89. Han CD, Oh T, Cho SN, Yang JH, Park KK. Isoniazid could be used for antibiotic-loaded bone cement for musculoskeletal tuberculosis: an in vitro study. *Clin Orthop Relat Res.* 2013;471(7):2400-6.
90. Hanssen AD. Prophylactic use of antibiotic bone cement: an emerging standard-in opposition. *J Arthroplasty.* 2004;19(4 Suppl 1):73-7.
91. Hanssen AD, Rand JA. Evaluation and treatment of infection at the site of a total hip or knee arthroplasty. *Instr Course Lect.* 1999;48:111-22.
92. Hanssen AD, Spangehl MJ. Practical applications of antibiotic-loaded bone cement for treatment of infected joint replacements. *Clin Orthop Relat Res.* 2004(427):79-85.
93. Harper EJ, Braden M, Bonfield W, Dingeldein E, Wahlig H. Influence of sterilization upon a range of properties of experimental bone cements. *J Mater Sci Mater Med.* 1997;8(12):849-53.

94. He Y, Trotignon JP, Loty B, Tcharkhtchi A, Verdu J. Effect of antibiotics on the properties of poly(methylmethacrylate)-based bone cement. *J Biomed Mater Res.* 2002;63(6):800-6.
95. Hofmann AA, Goldberg TD, Tanner AM, Cook TM. Ten-year experience using an articulating antibiotic cement hip spacer for the treatment of chronically infected total hip. *J Arthroplasty.* 2005;20(7):874-9.
96. Hofmann MP, Gbureck U, Duncan CO, Dover MS, Barralet JE. Carvable calcium phosphate bone substitute material. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2007;83(1):1-8.
97. Hosseinzadeh HRS, Masoudi A, Shahi AS, Lahiji F, Emami M, Emami S. *The Acrylic Bone Cement in Arthroplasty: INTECH Open Access Publisher; 2013.*
98. Hsieh PH, Chen LH, Chen CH, Lee MS, Yang WE, Shih CH. Two-stage revision hip arthroplasty for infection with a custom-made, antibiotic-loaded, cement prosthesis as an interim spacer. *J Trauma.* 2004;56(6):1247-52.
99. Hsieh PH, Tai CL, Lee PC, Chang YH. Liquid gentamicin and vancomycin in bone cement: a potentially more cost-effective regimen. *J Arthroplasty.* 2009;24(1):125-30.
100. Hu C, Feng H, Zhu C. Preparation and characterization of rifampicin-PLGA microspheres/sodium alginate in situ gel combination delivery system. *Colloids Surf B, Biointerfaces.* 2012;95:162-9.
101. Jaeblo T. Polymethylmethacrylate: properties and contemporary uses in orthopaedics. *J Am Acad Orthop Surg.* 2010;18(5):297-305.
102. Jain D, Bar-Shalom D. Alginate drug delivery systems: application in context of pharmaceutical and biomedical research. *Drug Dev Ind Pharm.* 2014;40(12):1576-84.
103. Jansen E, Stogiannidis I, Malmivaara A, Pajamaki J, Puolakka T, Kontinen YT. Outcome of prosthesis exchange for infected knee arthroplasty: the effect of treatment approach. *Acta Orthop.* 2009;80(1):67-77.
104. Jiranek WA, Hanssen AD, Greenwald AS. Antibiotic-loaded bone cement for infection prophylaxis in total joint replacement. *J Bone Joint Surg Am.* 2006;88(11):2487-500.
105. Josefsson G, Gudmundsson G, Kolmert L, Wijkstrom S. Prophylaxis with systemic antibiotics versus gentamicin bone cement in total hip arthroplasty. A five-year survey of 1688 hips. *Clin Orthop Relat Res.* 1990(253):173-8.
106. Judet J, Judet R. The use of an artificial femoral head for arthroplasty of the hip joint. *J Bone Joint Surg Br.* 1950;32-B(2):166-73.
107. Kalmeijer MD, Coertjens H, van Nieuwland-Bollen PM, Bogaers-Hofman D, de Baere GA, Stuurman A, et al. Surgical site infections in orthopedic surgery: the effect of

mupirocin nasal ointment in a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Clin Infect Dis* 2002;35(4):353-8.

108. Kamath MP, Shenoy BD, Tiwari SB, Karki R, Udupa N, Kotian M. Prolonged release biodegradable vesicular carriers for rifampicin--formulation and kinetics of release. *Ind J Exp Biol*. 2000;38(2):113-8.

109. Katagiri H, Sato K, Takahashi M, Sugiura H, Yamamura S, Iwata H. Use of adriamycin-impregnated methylmethacrylate in the treatment of tumor metastases in the long bones. *Arch Orthop Trauma Surg*. 1997;116(6-7):329-33.

110. Kim DH, Spencer M, Davidson SM, Li L, Shaw JD, Gulczynski D, et al. Institutional prescreening for detection and eradication of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in patients undergoing elective orthopaedic surgery. *J Bone Joint Surg Am*. 2010;92(9):1820-6.

111. König DP, Schierholz JM, Munnich U, Rutt J. Treatment of staphylococcal implant infection with rifampicin-ciprofloxacin in stable implants. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2001;121(5):297-9.

112. Kuehn KD. Up-to-date comparison of physical and chemical properties of commercial materials. In: Kuehn KD, editor. *Bone cements*. Berlin: Springer Verlag; 2000. p. 7-20.

113. Kuehn KD, Ege W, Gopp U. Acrylic bone cements: composition and properties. *Orthop Clin North Am*. 2005;36(1):17-28, v.

114. Kühn KD. *Bone cements*. Berlin: Springer-Verlag; 2000.

115. Kurtz SM, Ong KL, Schmier J, Mowat F, Saleh K, Dybvik E, et al. Future clinical and economic impact of revision total hip and knee arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am*. 2007;89 Suppl 3:144-51.

116. Labitzke R, Paulus M. Intraoperative measuring of temperature in the surgery of hip during the polymerisation of the bone cement palacos. *Arch Orthop Unfallchir*. 1974;79(4):341-6.

117. Laffer RR, Graber P, Ochsner PE, Zimmerli W. Outcome of prosthetic knee-associated infection: evaluation of 40 consecutive episodes at a single centre. *Clin Microbiol Infect*. 2006;12(5):433-9.

118. Lautenschlager EP, Marshall GW, Marks KE, Schwartz J, Nelson CL. Mechanical strength of acrylic bone cements impregnated with antibiotics. *J Biomed Mater Res*. 1976;10(6):837-45.

119. Lee AJ, Wrighton JD. Some properties of polymethylmethacrylate with reference to its use in orthopedic surgery. *Clin Orthop Relat Res*. 1973(95):281-7.

120. Lewis G. Properties of antibiotic-loaded acrylic bone cements for use in cemented arthroplasties: a state-of-the-art review. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2009;89B(2):558-74.
121. Lewis G, Janna S. The in vitro elution of gentamicin sulfate from a commercially available gentamicin-loaded acrylic bone cement, VersaBond AB. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2004;71(1):77-83.
122. Lidgren L, Bodelind B, Moller J. Bone cement improved by vacuum mixing and chilling. *Acta Orthop Scand.* 1987;58(1):27-32.
123. Love C, Marwin SE, Palestro CJ. Nuclear medicine and the infected joint replacement. *Semin Nucl Med.* 2009;39(1):66-78.
124. Ma G. Microencapsulation of protein drugs for drug delivery: strategy, preparation, and applications. *J Control Release.* 2014;193:324-40.
125. MacAvoy MC, Ries MD. The ball and socket articulating spacer for infected total knee arthroplasty. *J Arthroplasty.* 2005;20(6):757-62.
126. Mader JT AK. Experimental osteomyelitis. D S, editor. New York Springer; 1988.
127. Mah TF, O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol.* 2001;9(1):34-9.
128. Mangram AJ, Horan TC, Pearson ML, Silver LC, Jarvis WR. Guideline for Prevention of Surgical Site Infection, 1999. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) Hospital Infection Control Practices Advisory Committee. *Am J Infect Control.* 1999;27(2):97-132.
129. Marculescu CE, Berbari EF, Hanssen AD, Steckelberg JM, Osmon DR. Prosthetic joint infection diagnosed postoperatively by intraoperative culture. *Clin Orthop Relat Res.* 2005;439:38-42.
130. Masquelet AC, Begue T. The concept of induced membrane for reconstruction of long bone defects. *Orthop Clin North Am.* 2010;41(1):27-37.
131. Masri BA, Duncan CP, Beauchamp CP. Long-term elution of antibiotics from bone-cement: an in vivo study using the prosthesis of antibiotic-loaded acrylic cement (Prostalac) system. *J Arthroplasty.* 1998;13(3):331-8.
132. Masri BA, Panagiotopoulos KP, Greidanus NV, Garbuz DS, Duncan CP. Cementless two-stage exchange arthroplasty for infection after total hip arthroplasty. *J Arthroplasty.* 2007;22(1):72-8.
133. Materials ASfTa. Standard specification for acrylic bone cement (ASTM F451-99a). 1999.

134. Matos AC, Marques CF, Pinto RV, Ribeiro IA, Goncalves LM, Vaz MA, et al. Novel doped calcium phosphate-PMMA bone cement composites as levofloxacin delivery systems. *Int J Pharm.* 2015;490(1-2):200-8.
135. McDowell A, Patrick S. Evaluation of nonculture methods for the detection of prosthetic hip biofilms. *Clin Orthop Relat Res.* 2005(437):74-82.
136. McLaren AC, McLaren SG, Hickmon MK. Sucrose, xylitol, and erythritol increase PMMA permeability for depot antibiotics. *Clin Orthop Relat Res.* 2007;461:60-3.
137. McLaren AC, Nugent M, Economopoulos K, Kaul H, Vernon BL, McLemore R. Hand-mixed and premixed antibiotic-loaded bone cement have similar homogeneity. *Clin Orthop Relat Res.* 2009;467(7):1693-8.
138. McPherson EJ. Deactivation of Palacos R bone cement with the addition of rifampicin antibiotic powder. An in-vivo experience. Case report. *Reconstructive Review.* 2011;1(1).
139. Messick KJ, Miller MA, Damron LA, Race A, Clarke MT, Mann KA. Vacuum-mixing cement does not decrease overall porosity in cemented femoral stems: an in vitro laboratory investigation. *J Bone Joint Surg Br.* 2007;89(8):1115-21.
140. Mirra JM, Marder RA, Amstutz HC. The pathology of failed total joint arthroplasty. *Clin Orthop Relat Res.* 1982(170):175-83.
141. Morgan PM, Sharkey P, Ghanem E, Parvizi J, Clohisy JC, Burnett RS, et al. The value of intraoperative Gram stain in revision total knee arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am.* 2009;91(9):2124-9.
142. Morimoto S, Futani H, Ogura H, Okayama A, Maruo S. Successful reimplantation of total femoral prosthesis after deep infection. *J Arthroplasty.* 2003;18(2):216-20.
143. Morshed S, Huffman GR, Ries MD. Extended trochanteric osteotomy for 2-stage revision of infected total hip arthroplasty. *J Arthroplasty.* 2005;20(3):294-301.
144. Moyad TF, Thornhill T, Estok D. Evaluation and management of the infected total hip and knee. *Orthopedics.* 2008;31(6):581-8.
145. Murillo O, Domenech A, Euba G, Verdaguer R, Tubau F, Cabo J, et al. Efficacy of linezolid alone and in combination with rifampin in staphylococcal experimental foreign-body infection. *J Infect.* 2008;57(3):229-35.
146. Nicholas MK, Waters MG, Holford KM, Adusei G. Analysis of rheological properties of bone cements. *J Mater Sci Mater Med.* 2007;18(7):1407-12.
147. Norden C, Nelson JD, Mader JT, Calandra GB. Evaluation of new anti-infective drugs for the treatment of infections of prosthetic hip joints. *Infectious Diseases Society of America and the Food and Drug Administration. Clin Infect Dis.* 1992;15 Suppl 1:S177-81.

148. Nowinski RJ, Gillespie RJ, Shishani Y, Cohen B, Walch G, Gobeze R. Antibiotic-loaded bone cement reduces deep infection rates for primary reverse total shoulder arthroplasty: a retrospective, cohort study of 501 shoulders. *J Shoulder Elbow Surg.* 2012;21(3):324-8.
149. Nugent M, McLaren A, Vernon B, McLemore R. Strength of antimicrobial bone cement decreases with increased poragen fraction. *Clin Orthop Relat Res.* 2010;468(8):2101-6.
150. O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol.* 2000;54:49-79.
151. Ong KL, Kurtz SM, Lau E, Bozic KJ, Berry DJ, Parvizi J. Prosthetic joint infection risk after total hip arthroplasty in the Medicare population. *J Arthroplasty.* 2009;24(6 Suppl):105-9.
152. Organization IS. ISO 5833:2002. Implants for surgery — Acrylic resin cements. Suiza: Technical Committee ISO/TC 150, Implants for surgery, Subcommittee SC 1, Materials.; 2002.
153. Organization IS. UNE-ISO 7619-1:2011. Caucho vulcanizado o termoplástico Determinación de la dureza de indentación Parte 1: Método del durómetro (dureza Shore). Madrid: AENOR; 2011.
154. Pandey R, Sharma S, Khuller GK. Oral poly(lactide-co-glycolide) nanoparticle based antituberculosis drug delivery: toxicological and chemotherapeutic implications. *Indian J Exp Biol.* 2006;44(6):459-67.
155. Panousis K, Grigoris P, Butcher I, Rana B, Reilly JH, Hamblen DL. Poor predictive value of broad-range PCR for the detection of arthroplasty infection in 92 cases. *Acta Orth.* 2005;76(3):341-6.
156. Parvizi J, Adeli B, Zmistowski B, Restrepo C, Greenwald AS. Management of periprosthetic joint infection: the current knowledge: AAOS exhibit selection. *J Bone Joint Surg Am.* 2012;94(14):e104.
157. Parvizi J, Alijanipour P, Barberi EF, Hickok NJ, Phillips KS, Shapiro IM, et al. Novel developments in the prevention, diagnosis, and treatment of periprosthetic joint infections. *J Am Acad Orthop Surg.* 2015;23 Suppl:S32-43.
158. Parvizi J, Gehrke T. Definition of periprosthetic joint infection. *J Arthroplasty.* 2014;29(7):1331.
159. Parvizi J, Saleh KJ, Ragland PS, Pour AE, Mont MA. Efficacy of antibiotic-impregnated cement in total hip replacement. *Acta Orthop.* 2008;79(3):335-41.
160. Paz E, Sanz-Ruiz P, Abenojar J, Vaquero-Martin J, Forriol F, Del Real JC. Evaluation of Elution and Mechanical Properties of High-Dose Antibiotic-Loaded Bone

Cement: Comparative "In Vitro" Study of the Influence of Vancomycin and Cefazolin. *J Arthroplasty*. 2015;30(8):1423-9.

161. Penner MJ, Duncan CP, Masri BA. The in vitro elution characteristics of antibiotic-loaded CMW and Palacos-R bone cements. *J Arthroplasty*. 1999;14(2):209-14.

162. Penner MJ, Masri BA, Duncan CP. Elution characteristics of vancomycin and tobramycin combined in acrylic bone-cement. *J Arthroplasty*. 1996;11(8):939-44.

163. Pérez Mañanes R, Vaquero Martín J, Villanueva Martínez M. Estudio experimental sobre el patrón de penetración del cemento óseo en la artroplastia de rodilla según la técnica de cementación empleada. *Trauma Fund MAPFRE*. 2012;23(1):48-58.

164. Pérez Mañanes R, Vaquero Martín J, Villanueva Martínez M. Influencia de la técnica de cementación sobre la calidad del manto de cemento en la artroplastia de rodilla. Estudio experimental sobre un modelo sintético. *Rev Esp Cir Ortop Traumatol*. 2011;55(1):39-49.

165. Perez-Villar F, Moscoso-Gonzalez J, Joran-Espuys J, Rocha-Sole M, Fernandez-Martinez J. Recambio en un tiempo para la infección periprotésica de la rodilla. *Rev Esp Cir Ortop Traumatol*. 2010;54(1):39-43.

166. Rao N, Cannella B, Crossett LS, Yates AJ, Jr., McGough R, 3rd. A preoperative decolonization protocol for staphylococcus aureus prevents orthopaedic infections. *Clin Orthop Relat Res*. 2008;466(6):1343-8.

167. Reckling FW, Dillon WL. The bone-cement interface temperature during total joint replacement. *J Bone Joint Surg Am*. 1977;59(1):80-2.

168. Register TNA. Report 2010.

169. Reinartz P. FDG-PET in patients with painful hip and knee arthroplasty: technical breakthrough or just more of the same. *Q J Nucl Med Mol Imaging*. 2009;53(1):41-50.

170. Roisman FR, Walz DT, Finkelstein AE. Superoxide radical production by human leukocytes exposed to immune complexes: inhibitory action of gold compounds. *Inflammation*. 1983;7(4):355-62.

171. Rosenberg AD, Wambold D, Kraemer L, Begley-Keyes M, Zuckerman SL, Singh N, et al. Ensuring appropriate timing of antimicrobial prophylaxis. *J Bone Joint Surg Am*. 2008;90(2):226-32.

172. Sabokbar A AN, Murray DW. Osteolysis induced by radio-opaque agents. In: Walenkamp GHIM MD, editor. *Bone cement and cementing technique*. New York: Springer Verlag; 2001. p. 149-62.

173. Saha S, Pal S. Mechanical properties of bone cement: a review. *J Biomed Mater Res.* 1984;18(4):435-62.
174. Sanchez-Sotelo J, Berry DJ, Hanssen AD, Cabanela ME. Midterm to long-term followup of staged reimplantation for infected hip arthroplasty. *Clin Orthop Relat Res.* 2009;467(1):219-24.
175. Sanz-Ruiz P, Paz E, Abenojar J, Carlos del Real J, Vaquero J, Forriol F. Effects of vancomycin, cefazolin and test conditions on the wear behavior of bone cement. *J Arthroplasty.* 2014;29(1):16-22.
176. Sarfaraz M, Hiremath D, Chowdary KP. Formulation and characterization of rifampicin microcapsules. *Indian J Pharm Sci.* 2010;72(1):101-5.
177. Segawa H, Tsukayama DT, Kyle RF, Becker DA, Gustilo RB. Infection after total knee arthroplasty. A retrospective study of the treatment of eighty-one infections. *J Bone Joint Surg Am.* 1999;81(10):1434-45.
178. Serbetci K KF, Hasirci N. Thermal and mechanical properties of hydroxyapatite impregnated acrylic bone cements. *Polymer Testing.* 2004;23(2):145-55.
179. Shahi A, Deirmengian C, Higuera C, Chen A, Restrepo C, Zmistowski B, et al. Premature Therapeutic Antimicrobial Treatments Can Compromise the Diagnosis of Late Periprosthetic Joint Infection. *Clin Orthop Relat Res.* 2015;473(7):2244-9.
180. Shi M, Kretlow JD, Nguyen A, Young S, Scott Baggett L, Wong ME, et al. Antibiotic-releasing porous polymethylmethacrylate constructs for osseous space maintenance and infection control. *Biomaterials.* 2010;31(14):4146-56.
181. Shukla SK, Ward JP, Jacofsky MC, Sporer SM, Paprosky WG, Della Valle CJ. Perioperative testing for persistent sepsis following resection arthroplasty of the hip for periprosthetic infection. *J Arthroplasty.* 2010;25(6 Suppl):87-91.
182. Simor AE, Phillips E, McGeer A, Konvalinka A, Loeb M, Devlin HR, et al. Randomized controlled trial of chlorhexidine gluconate for washing, intranasal mupirocin, and rifampin and doxycycline versus no treatment for the eradication of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization. *Clin Infect Dis* 2007;44(2):178-85.
183. Soriano A, Gomez J, Gomez L, Azanza JR, Perez R, Romero F, et al. Efficacy and tolerability of prolonged linezolid therapy in the treatment of orthopedic implant infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2007;26(5):353-6.
184. Springer BD, Lee GC, Osmon D, Haidukewych GJ, Hanssen AD, Jacofsky DJ. Systemic safety of high-dose antibiotic-loaded cement spacers after resection of an infected total knee arthroplasty. *Clin Orthop Relat Res.* 2004(427):47-51.

185. Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet*. 2001;358(9276):135-8.
186. Stumpe KD, Notzli HP, Zanetti M, Kamel EM, Hany TF, Gorres GW, et al. FDG PET for differentiation of infection and aseptic loosening in total hip replacements: comparison with conventional radiography and three-phase bone scintigraphy. *Radiology*. 2004;231(2):333-41.
187. Sullivan SJ, Topoleski LD. Influence of initial component temperature on the apparent viscosity and handling characteristics of acrylic (PMMA) bone cement. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2007;81(1):224-30.
188. Takenaga M, Ohta Y, Tokura Y, Hamaguchi A, Igarashi R, Disrathakit A, et al. Lipid microsphere formulation containing rifampicin targets alveolar macrophages. *Drug Deliv*. 2008;15(3):169-75.
189. Tehranzadeh J, Gubernick I, Blaha D. Prospective study of sequential technetium-99m phosphate and gallium imaging in painful hip prostheses (comparison of diagnostic modalities). *Clin Nucl Med*. 1988;13(4):229-36.
190. Thonse R, Conway J. Antibiotic cement-coated interlocking nail for the treatment of infected nonunions and segmental bone defects. *J Orthop Trauma*. 2007;21(4):258-68.
191. Toksvig-Larsen S, Franzen H, Ryd L. Cement interface temperature in hip arthroplasty. *Acta Orthop Scand*. 1991;62(2):102-5.
192. Toulson C, Walcott-Sapp S, Hur J, Salvati E, Bostrom M, Brause B, et al. Treatment of infected total hip arthroplasty with a 2-stage reimplantation protocol: update on "our institution's" experience from 1989 to 2003. *J Arthroplasty*. 2009;24(7):1051-60.
193. Trampuz A, Piper KE, Jacobson MJ, Hanssen AD, Unni KK, Osmon DR, et al. Sonication of removed hip and knee prostheses for diagnosis of infection. *N Engl J Med*. 2007;357(7):654-63.
194. Trampuz A, Zimmerli W. Prosthetic joint infections: update in diagnosis and treatment. *Swiss medical weekly*. 2005;135(17-18):243-51.
195. Traub WH, Leonhard B. Heat stability of the antimicrobial activity of sixty-two antibacterial agents. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 1995;35(1):149-54.
196. Vasso M, Schiavone Panni A. Low-grade periprosthetic knee infection: diagnosis and management. *J Orthop Traumatol*. 2015;16(1):1-7.
197. Vilchez F, Martinez-Pastor JC, Garcia-Ramiro S, Bori G, Tornero E, Garcia E, et al. Efficacy of debridement in hematogenous and early post-surgical prosthetic joint infections. *Int J Artif Organs*. 2011;34(9):863-9.

198. Villanueva M, Ríos A, Chana F, Pereiro J, Fahandezh-Saddid H, García-Lechuz J, et al. Tratamiento en dos tiempos de la artroplastia total de rodilla infectada: estudio comparativo entre dos tipos de espaciadores. *Rev Ortop Traumatol*. 2005;49:346-57.
199. Villanueva M, Rios A, Pereiro J, Chana F, Fahandez-Saddi H. Hand-made articulating spacers for infected total knee arthroplasty: a technical note. *Acta Orthop*. 2006;77(2):329-32.
200. Villanueva-Martinez M, Rios-Luna A, Pereiro J, Fahandez-Saddi H, Villamor A. Hand-made articulating spacers in two-stage revision for infected total knee arthroplasty: good outcome in 30 patients. *Acta Orthop*. 2008;79(5):674-82.
201. Wayne P. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement. CLSI document M100-S22. Clinical and Laboratory Standards Institute 2012.
202. Webb JC, Spencer RF. The role of polymethylmethacrylate bone cement in modern orthopaedic surgery. *J Bone Joint Surg Br*. 2007;89(7):851-7.
203. Widmer AF. New developments in diagnosis and treatment of infection in orthopedic implants. *Clin Infect Dis*. 2001;33 Suppl 2:S94-106.
204. Widmer AF, Frei R, Rajacic Z, Zimmerli W. Correlation between in vivo and in vitro efficacy of antimicrobial agents against foreign body infections. *J Infect Dis*. 1990;162(1):96-102.
205. Windsor RE, Bono JV. Infected Total Knee Replacements. *J Am Acad Orhop Surg*. 1994;2(1):44-53.
206. Wolcott RD, Rhoads DD, Bennett ME, Wolcott BM, Gogokhia L, Costerton JW, et al. Chronic wounds and the medical biofilm paradigm. *J Wound Care*. 2010;19(2):45-6, 8-50, 2-3.
207. Wu J, Kong T, Yeung KW, Shum HC, Cheung KM, Wang L, et al. Fabrication and characterization of monodisperse PLGA-alginate core-shell microspheres with monodisperse size and homogeneous shells for controlled drug release. *Acta Biomater*. 2013;9(7):7410-9.
208. Zalavras CG, Patzakis MJ, Holtom P. Local antibiotic therapy in the treatment of open fractures and osteomyelitis. *Clin Orthop Relat Res*. 2004(427):86-93.
209. Zhuang H, Duarte PS, Pourdehnad M, Maes A, Van Acker F, Shnier D, et al. The promising role of 18F-FDG PET in detecting infected lower limb prosthesis implants. *J Nucl Med*. 2001;42(1):44-8.
210. Zimmerli W, Trampuz A, Ochsner PE. Prosthetic-joint infections. *N Engl J Med*. 2004;351(16):1645-54.

211. Zimmerli W, Widmer AF, Blatter M, Frei R, Ochsner PE. Role of rifampin for treatment of orthopedic implant-related staphylococcal infections: a randomized controlled trial. Foreign-Body Infection (FBI) Study Group. *Jama*. 1998;279(19):1537-41.

ANEXO

9. ANEXO

Tabla 3. Factores de riesgo para infección protésica estratificados (74)

Síntomas	Factores riesgo con evidencia demostrada	Factores riesgo con evidencia consensuada	Hallazgos físicos	Otros
1 Dolor en la articulación reemplazada 2 Rigidez en la articulación reemplazada	1 Infección articular previa 2 Infección superficial herida quirúrgica 3 Obesidad 4 Tiempo cirugía (>2,5h) 5 Inmunosupresión	1 Bacteriemia (<1 año) 2 Infección periarticular 3 Alteraciones cutáneas 4 Uso drogas intravenosas 5 Infección/colonización por SARM reciente (<3 años) 6 Infección activa en otra localización	1 Calor, rubor, dolor, tumor 2 Fístula articular	1 Aflojamiento precoz (<5 años) u osteolisis implante (visto por radiografía)

Tabla 5. Tipos de copolímeros presentes en los diferentes cementos comerciales. MMA: metacrilato de metilo; MA: metacrilato; BMA: metacrilato de bencilo

Tipo de copolímero	Marca comercial
Homopolímero MMA	CMW1
	CMW3
Copolímero MMA/MA	Palacos R
	Palamed
	Osteopal
	Bone cement R
	SmartSet HV
Copolímero MMA/BMA	Sulfix/Duracem
	Biolos 1
	Biolos 3
	Boneloc
Copolímero MMA/Estireno	Surgical Simplex Ro
	CMW Endurance
	Zimmer Osteobond

Tabla 6. Algunos cementos comerciales de alta y baja viscosidad

Alta viscosidad	Baja viscosidad
Palacos® R y Palamed® (Heraeus Medical GmbH, Wehrheim, Alemania)	Osteopal® y Palacos® LV (Heraeus Medical GmbH, Wehrheim, Alemania)
CMW®1 (DePuy CMW, Blackpool, Reino Unido)	Sulcem® (Sulzer Orthopedics., Baar, Suiza)
Simplex® (Stryker, Mahwah, NJ, EEUU)	CMW®3 (DePuy CMW, Blackpool, Reino Unido)

Tabla 8. Parámetros de liberación de distintos antimicrobianos del PMMA. AUC = área bajo la curva

Antibiótico	Cantidad (%)	AUC (µg/ml/h)	Concentración (µg/ml)	Tiempo en que deja de detectarse (h)	% en cuenta antes de elución
Cefazolina	2.5	18 ± 3	15 ± 2	2	56
	7.5	162 ± 33	62 ± 23	10	42
	15	1792 ± 47	147 ± 22	26	54
Ciprofloxacino	2.5	23 ± 5	5 ± 0	45	36
	7.5	112 ± 3	15 ± 1	45	36
	15	307 ± 10	54 ± 3	48	31
Gatifloxacino	2.5	157 ± 34	15 ± 2	48	45
	7.5	190 ± 65	19 ± 1	48	47
	15	499 ± 51	51 ± 3	48	50
Levofloxacino	2.5	33 ± 4	7 ± 1	48	28
	7.5	123 ± 7	26 ± 3	48	23
	15	291 ± 59	52 ± 10	48	24
Linezolid	2.5	No detectado	≤5	0	96
	7.5	214 ± 53	43 ± 4	12	88
	15	224 ± 155	64 ± 47	22	84
Rifampicina	2.5	5 ± 2	4 ± 1	2	21
	7.5	147 ± 15	15 ± 2	37	27
	15	409 ± 46	31 ± 11	48	24

Tabla 9. Cementos con gentamicina disponibles en Europa

Nombre del cemento	Casa comercial
Palacos® R+G	Heraeus Medical GmbH, Wehrheim, Alemania
Palamed® G	Heraeus Medical GmbH, Wehrheim, Alemania
Palacos® LVG	Heraeus Medical GmbH, Wehrheim, Alemania
CMW®1 G	DePuy CMW, Blackpool, Reino Unido
CMW®3 G	DePuy CMW, Blackpool, Reino Unido

Tabla 14. Concentraciones ($\mu\text{g/ml}$) por triplicado y absorbancia de cada una de las muestras de microcápsulas. M1 y M2: PHBV, M3 y M4: ácido esteárico, M5: etilcelulosa y M6: alginato. CC: concentración; A: absorbancia; λ : longitud de onda

Muestra	CC ($\mu\text{g/ml}$)	A ($\lambda=334$)
M1	26.30	0.88
	25.90	0.87
	22.50	0.76
M2	22.90	0.77
	24.40	0.82
	23.20	0.78
M3	3.10	0.10
	3.10	0.10
	3.10	0.10
M4	17.40	0.58
	14.60	0.49
	17.00	0.57
M5	70.30	2.36
	71.80	2.41
	67.50	2.70
M6	11.20	0.38
	9.90	0.33
	8.10	0.27

Tabla 15. Significación estadística obtenida al comparar las concentraciones de rifampicina de las diferentes muestras (M1 y M2: PHBV, M3 y M4: ácido esteárico, M5: etilcelulosa y M6: alginato)

(I) Muestra	(J) Muestra	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.
M1	M2	1.40	1.27	1.000
	M3	21.80 [*]	1.27	0.0001
	M4	8.57 [*]	1.27	0.0001
	M5	-44.97 [*]	1.27	0.0001
	M6	15.17 [*]	1.27	0.0001
M2	M1	-1.40	1.27	1.000
	M3	20.40 [*]	1.27	0.0001
	M4	7.17 [*]	1.27	0.002
	M5	-46.37 [*]	1.27	0.0001
	M6	13.77 [*]	1.27	0.0001
M3	M1	-21.80 [*]	1.27	0.0001
	M2	-20.40 [*]	1.27	0.0001
	M4	-13.23 [*]	1.27	0.0001
	M5	-66.77 [*]	1.27	0.0001
	M6	-6.63 [*]	1.27	0.003
M4	M1	-8.57 [*]	1.27	0.0001
	M2	-7.17 [*]	1.27	0.002
	M3	13.23 [*]	1.27	0.0001
	M5	-53.53 [*]	1.27	0.0001
	M6	6.60 [*]	1.27	0.003
M5	M1	44.97 [*]	1.27	0.0001
	M2	46.37 [*]	1.27	0.0001
	M3	66.77 [*]	1.27	0.0001
	M4	53.53 [*]	1.27	0.0001
	M6	60.13 [*]	1.27	0.0001
M6	M1	-15.17 [*]	1.27	0.0001
	M2	-13.77 [*]	1.27	0.0001
	M3	6.63 [*]	1.27	0.003
	M4	-6.60 [*]	1.27	0.003
	M5	-60.13 [*]	1.27	0.0001

Tabla 19. Elución de cada muestra de micropartículas en PBS en los diferentes momentos de medida (6, 24 y 48h, 1, 2 y 5s). Se realizaron las medidas por triplicado. M1 y M2: PHBV, M3 y M4: ácido esteárico, M5: etilcelulosa y M6: alginato. CC: concentración (en µg/ml); A: absorbancia

	6h		24h		48h		1s		2s		5s	
	CC (µg/ml)	A	CC (µg/ml)	A	CC (µg/ml)	A	CC (µg/ml)	A	CC (µg/ml)	A	CC (µg/ml)	A
M1	15.70	0.46	18.20	0.52	22.00	0.62	20.40	0.51	26.60	0.61	30.06	0.51
	16.40	0.47	20.30	0.58	21.60	0.61	22.20	0.56	26.90	0.61	32.90	0.55
	15.70	0.46	19.70	0.56	21.70	0.61	22.70	0.57	28.20	0.64	32.20	0.53
M2	15.10	0.44	19.80	0.57	21.60	0.61	24.30	0.61	22.40	0.51	31.40	0.52
	15.30	0.44	20.60	0.59	23.00	0.64	24.30	0.61	26.10	0.60	31.00	0.52
	15.30	0.44	20.20	0.58	22.40	0.63	25.10	0.63	26.30	0.60	31.00	0.52
M3	3.10	0.10	3.70	0.12	3.70	0.11	4.40	0.10	4.80	0.11	4.50	0.09
	3.30	0.11	3.40	0.11	4.00	0.12	4.50	0.11	4.60	0.10	6.30	0.12
	3.40	0.11	3.70	0.12	4.10	0.12	4.70	0.11	4.50	0.10	4.60	0.09
M4	17.80	0.51	18.30	0.53	14.70	0.42	17.00	0.42	18.00	0.41	18.90	0.32
	20.30	0.59	19.50	0.56	20.60	0.58	18.90	0.47	18.80	0.43	18.30	0.31
	18.40	0.53	20.90	0.60	16.10	0.46	16.60	0.41	15.00	0.34	19.00	0.32
M5	3.60	0.11	8.20	0.25	10.90	0.31	22.80	0.57	33.60	0.77	43.70	0.72
	3.80	0.12	7.20	0.22	10.90	0.31	19.80	0.49	32.00	0.73	44.50	0.73
	3.70	0.12	8.40	0.25	11.70	0.33	22.70	0.57	29.90	0.68	43.70	0.72
M6	23.50	0.67	67.40	1.90	98.30	2.73	89.90	2.28	113.70	2.60	107.20	1.75
	31.20	0.89	64.60	1.82	88.00	2.44	92.50	2.34	104.10	2.38	131.80	2.15
	30.10	0.86	64.50	1.82	88.60	2.45	85.50	2.16	107.40	2.45	129.90	2.12

Tabla 25. Absorbancia y concentraciones de rifampicina de cada una de las 8 muestras de las microcápsulas de PHBV (se realizaron varias mediciones en cada muestra). A: absorbancia; CC: concentración ($\mu\text{g/ml}$)

	A	CC ($\mu\text{g/ml}$)
1	0.66	21.10
	0.60	19.20
	0.69	22.00
	0.69	22.00
	0.56	17.70
2	0.52	16.40
	0.46	14.40
	0.56	17.80
3	0.68	21.80
	0.64	20.30
	0.67	21.40
4	0.49	15.30
	0.49	15.40
	0.47	14.80
5	0.63	20.20
	0.59	18.70
	0.60	19.00
6	0.53	16.50
	0.47	14.70
	0.51	16.20
7	0.52	13.50
	0.46	14.40
	0.56	19.00
8	0.48	14.90
	0.54	16.90
	0.51	16.10

Tabla 26. Absorbancia y concentraciones de rifampicina de cada una de las 4 muestras de las microcápsulas de alginato (se realizaron 5 mediciones en cada muestra). A: absorbancia; CC: concentración ($\mu\text{g/ml}$)

	A	CC ($\mu\text{g/ml}$)
A	1.42	62.20
	1.48	64.70
	1.65	72.80
	1.75	77.30
	1.61	70.00
B	1.34	58.40
	1.52	66.80
	1.38	60.10
	1.23	53.10
	1.44	63.20
C	1.11	47.70
	1.16	50.30
	1.14	48.90
	1.02	43.70
	1.10	47.30
D	0.92	38.80
	0.86	36.30
	0,80	33.40
	0.88	37.20
	0.80	33.20

Figura 37. Comparación de la elución de rifampicina de las microcápsulas de PHBV (PHBV1, PHBV2 y PHBV3) y alginato (ALG4, ALG5 y ALG6) a lo largo del tiempo

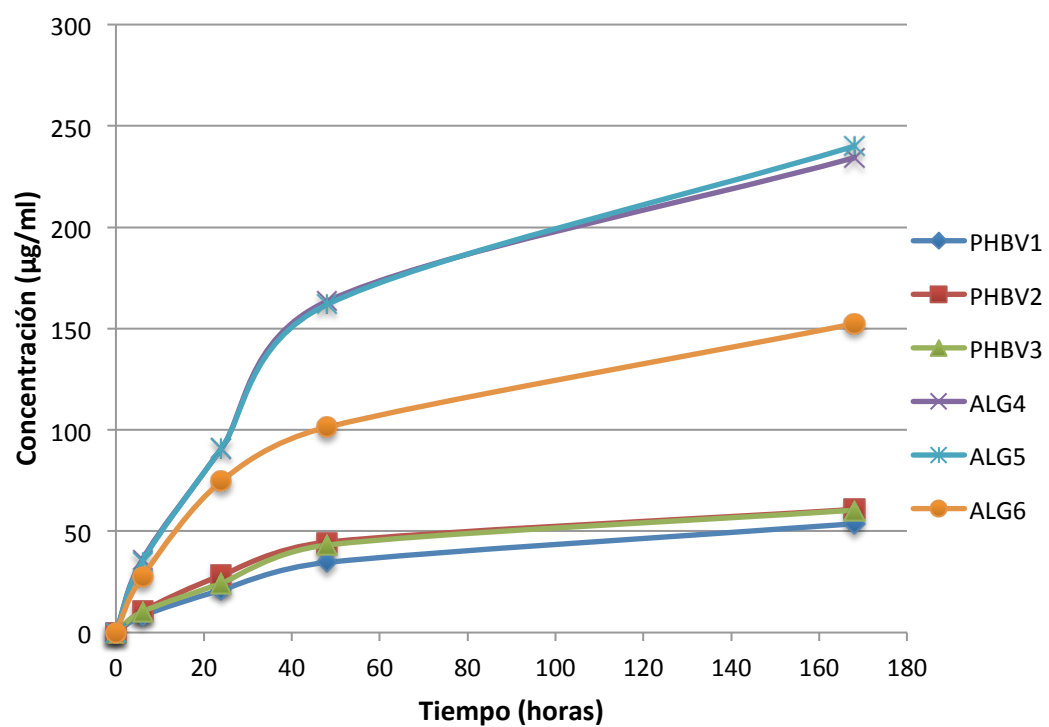


Tabla 32. Niveles de significación estadística obtenidos al comparar la elución de rifampicina en PBS de las diferentes muestras de microcápsulas a las 6h. Se señalan con asterisco los niveles de $p < 0.05$

Tiempo de medida: 6h	
Comparación	Nivel de significación estadística
PHBV1-PHBV2	1
PHBV1-PHBV3	1
PHBV1-ALG4	0*
PHBV1-ALG5	0*
PHBV1-ALG6	0*
PHBV2-PHBV3	1
PHBV2-ALG4	0*
PHBV2-ALG5	0*
PHBV2-ALG6	0.001*
PHBV3-ALG4	0*
PHBV3-ALG5	0*
PHBV3-ALG6	0.001*
ALG4-ALG5	1
ALG4-ALG6	0.219
ALG5-ALG6	1

Tabla 33. Niveles de significación estadística obtenidos al comparar la elución de rifampicina en PBS de las diferentes muestras de microcápsulas a las 24h. Se señalan con asterisco los niveles de $p < 0.05$

Tiempo de medida: 24h	
Comparación	Nivel de significación estadística
PHBV1-PHBV2	1
PHBV1-PHBV3	1
PHBV1-ALG4	0*
PHBV1-ALG5	0*
PHBV1-ALG6	0*
PHBV2-PHBV3	1
PHBV2-ALG4	0*
PHBV2-ALG5	0*
PHBV2-ALG6	0 *
PHBV3-ALG4	0*
PHBV3-ALG5	0*
PHBV3-ALG6	0*
ALG4-ALG5	1
ALG4-ALG6	0.269
ALG5-ALG6	0.147

Tabla 34. Niveles de significación estadística obtenidos al comparar la elución de rifampicina en PBS de las diferentes muestras de microcápsulas a las 48h. Se señalan con asterisco los niveles de $p < 0.05$

Tiempo de medida: 48h	
Comparación	Nivel de significación estadística
PHBV1-PHBV2	1
PHBV1-PHBV3	1
PHBV1-ALG4	0*
PHBV1-ALG5	0*
PHBV1-ALG6	0*
PHBV2-PHBV3	1
PHBV2-ALG4	0*
PHBV2-ALG5	0*
PHBV2-ALG6	0 *
PHBV3-ALG4	0*
PHBV3-ALG5	0*
PHBV3-ALG6	0*
ALG4-ALG5	1
ALG4-ALG6	0.04*
ALG5-ALG6	0.081

Tabla 35. Niveles de significación estadística obtenidos al comparar la elución de rifampicina en PBS de las diferentes muestras de microcápsulas a la semana. Se señalan con asterisco los niveles de $p < 0.05$

Tiempo de medida: 1s	
Comparación	Nivel de significación estadística
PHBV1-PHBV2	1
PHBV1-PHBV3	1
PHBV1-ALG4	0*
PHBV1-ALG5	0*
PHBV1-ALG6	0*
PHBV2-PHBV3	1
PHBV2-ALG4	0*
PHBV2-ALG5	0*
PHBV2-ALG6	0 *
PHBV3-ALG4	0*
PHBV3-ALG5	0*
PHBV3-ALG6	0*
ALG4-ALG5	0.565
ALG4-ALG6	0.001*
ALG5-ALG6	0*

Tabla 36. Absorbancia y concentraciones de rifampicina eluída por las microcápsulas de PHBV, en µg/ml. Se estudiaron tres ejemplares de tres muestras de micropartículas de PHBV (que corresponden a diferentes lotes). A: absorbancia; CC: concentración

PHBV	6 h		24 h		48 h		1 semana	
	A	CC	A	CC	A	CC	A	CC
1	0.27	9.30	0.40	13.90	0.32	11.10	0.50	20.20
	0.23	7.90	0.39	13.50	0.36	12.50	0.48	19.30
	0.22	7.50	0.32	10.80	0.49	17.30	0.44	17.80
2	0.32	11.10	0.59	20.40	0.51	18.00	0.47	18.70
	0.28	9.60	0.44	15.10	0.42	14.80	0.36	14.40
	0.32	10.90	0.51	17.50	0.46	16.40	0.39	15.40
3	0.31	10.40	0.41	14.30	0.50	17.70	0.46	18.40
	0.34	11.50	0.40	13.90	0.53	19.00	0.41	16.50
	0.26	8.80	0.41	14.10	0.56	19.80	0.42	16.80

Tabla 37. Absorbancia y concentraciones de rifampicina eluída por las microcápsulas de alginato, en µg/ml. Se estudiaron tres ejemplares de tres muestras de micropartículas de alginato (que corresponden a diferentes lotes). A: absorbancia; CC: concentración

Alginato	6 h		24 h		48 h		1 semana	
	A	CC	A	CC	A	CC	A	CC
4	0.92	30.20	1.60	57.20	2.13	76.80	1.81	71.60
	1.19	42.10	1.47	53.30	2.00	72.10	1.88	74.20
	1.11	35.60	1.49	53.90	1.92	69.20	1.69	66.80
5	0.84	29.30	1.56	55.10	1.61	58.00	1.89	74.70
	1.19	41.70	1.77	62.80	2.16	77.80	2.19	86.60
	0.98	34.30	1.39	49.20	2.15	77.40	1.85	73.20
6	0.75	26.10	1.34	47.20	1.55	55.70	1.31	51.80
	0.80	28.00	1.42	50.10	1.66	59.50	1.19	47.20
	0.81	28.40	1.25	44.30	1.52	54.70	1.37	54.10

Tabla 40. Concentraciones ($\mu\text{g/ml}$) y absorbancia de la rifampicina en PBS en cuatro momentos, tras añadir las muestras de cemento con rifampicina sin encapsular (se estudiaron 4 muestras y se calculó la media). A: absorbancia; CC: concentración; RIF: rifampicina

RIF	MASAS PROBETAS (mg)	mg RIF en probetas	6 h		24 h		48 h		1 semana	
			A	CC	A	CC	A	CC	A	CC
LOTE 1	478.60	5.98	0.01	0.10	0.01	0.10	0.01	0.10	0.01	0.60
	491.20	6.14	0.02	0.10	0.01	0.20	0.01	0.10	0.01	0.60
	500.90	6.26	0.02	0.10	0.01	0.20	0.01	0.10	0.01	0.70
	474.60	5.93	0.01	0.10	0.01	0.20	0.01	0.10	0.00	0.50
Media	486.30	6.08	0.01	0.00	0.01	0.18	0.01	0.10	0.01	0.60

Figura 38. Perfil de elución de las muestras de cemento con rifampicina sin encapsular. CC: concentración

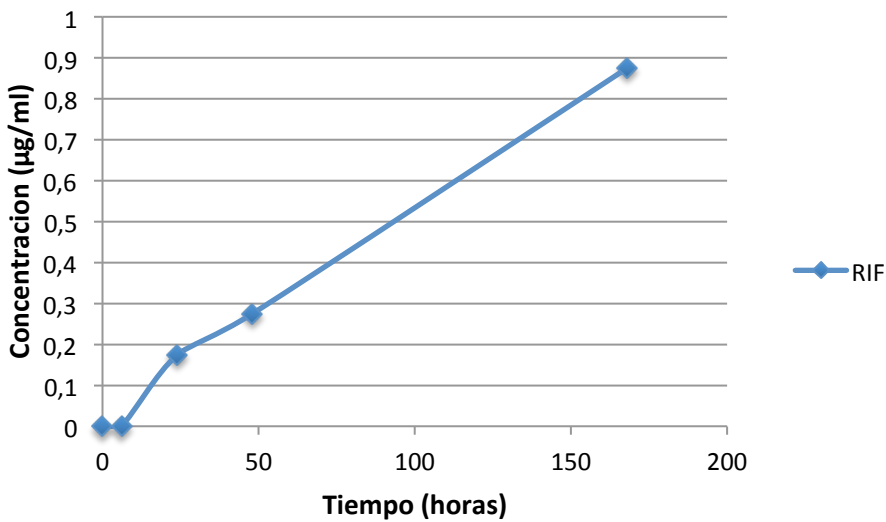


Tabla 41. Concentraciones ($\mu\text{g/ml}$) y absorbancia de la rifampicina en PBS en cuatro momentos, tras añadir las muestras de cemento con microcápsulas de PHBV. A: absorbancia; CC: concentración; MC: microcápsulas

PHBV	MASAS PROBETAS (mg)	mg MC en probetas	6 h		24 h		48 h		1 semana	
			A	CC	A	CC	A	CC	A	CC
LOTE 1	347.01	17.35	0.01	0.10	0.00	0.40	0.00	0.40	0.00	0.40
	387.25	19.36	0.01	0.10	0.00	0.50	0.00	0.40	0.00	0.40
	399.93	20.00	0.01	0.10	0.00	0.50	0.00	0.40	0.00	0.40
	384.66	19.23	0.01	0.10	0.00	0.50	0.00	0.40	0.00	0.40
	416.90	20.85	0.01	0.10	0.00	0.50	0.00	0.40	0.00	0.30
Media	397.19	19.86	0.01	0.10	0.00	0.48	0.00	0.40	0.00	0.38
LOTE 2	427.22	21.36	0.01	0.00	0.01	0.30	0.01	0.30	0.00	0.50
	413.24	20.66	0.01	0.00	0.00	0.50	0.00	0.30	0.00	0.30
	436.06	21.80	0.01	0.10	0.00	0.50	0.00	0.30	0.00	0.30
	427.14	21.36	0.01	0.10	0.00	0.40	0.00	0.50	0.00	0.30
	407.61	20.38	0.01	0.00	0.00	0.50	0.00	0.40	0.00	0.40
Media	421.01	21.05	0.01	0.04	0.00	0.44	0.00	0.36	0.00	0.36
LOTE 3	521.40	26.07	0.00	0.30	0.01	0.30	0.00	0.40	0.00	0.10
	511.00	25.55	0.01	0.10	0.01	0.20	0.01	0.30	0.00	0.20
	537.20	26.86	0.01	0.20	0.00	0.10	0.01	0.20	0.00	0.10
	514.90	25.75	0.00	0.50	0.00	0.40	0.00	0.50	0.00	0.20
Media	521.13	26.06	0.01	0.28	0.01	0.25	0.00	0.35	0.00	0.15
LOTE 4	350.70	17.54	0.00	0.40	0.01	0.30	0.00	0.30	0.00	0.30
	379.80	18.99	0.00	0.30	0.01	0.00	0.00	0.30	0.00	0.30
	393.70	19.69	0.01	0.30	0.00	0.40	0.00	0.30	0.00	0.30
	446.90	22.35	0.01	0.10	0.01	0.20	0.00	0.30	0.00	0.40
	448.50	22.43	0.00	0.40	0.00	0.40	0.00	0.30	0.00	0.20
Media	417.23	20.86	0.01	0.30	0.01	0.26	0.00	0.30	0.00	0.30

Figura 39. Perfil de elución de las muestras de cemento con microcápsulas de PHBV con rifampicina (valores medios para cada lote). CC: concentración

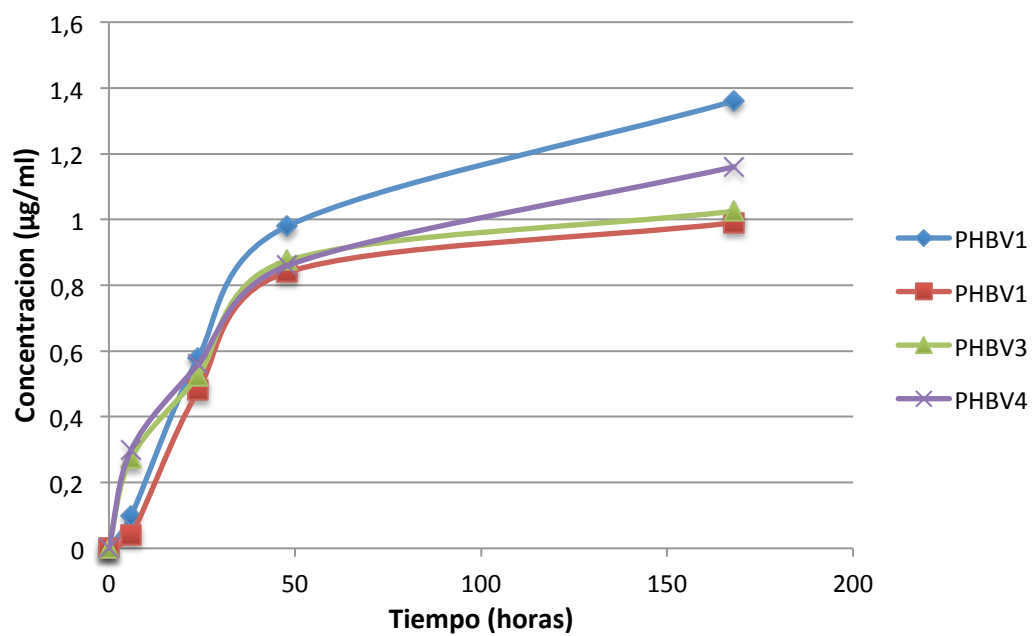


Tabla 42. Concentraciones ($\mu\text{g/ml}$) y absorbancia de la rifampicina en PBS en cuatro momentos, tras añadir las muestras de cemento con microcápsulas de alginato. A: absorbancia; CC: concentración; MC: microcápsulas

Alginato	MASAS PROBETAS (mg)	mg MC en probetas	6 h		24 h		48 h		1 semana	
			A	CC	A	CC	A	CC	A	CC
LOTE 1	509.47	25.47	0.04	1.10	0.04	1.10	0.04	0.80	0.04	1.80
	480.13	24.01	0.07	1.90	0.09	2.60	0.07	2.10	0.12	5.10
	491.13	24.56	0.10	3.00	0.07	2.00	0.02	0.20	0.04	1.80
	460.00	23.00	0.04	1.10	0.07	1.90	0.05	1.10	0.03	1.70
	476.17	23.81	0.18	5.90	0.11	3.40	0.05	1.20	0.02	1.20
Media	476.86	23.84	0.09	2.60	0.08	2.20	0.05	1.08	0.05	2.32
LOTE 2	470.70	23.54	0.10	3.20	0.04	0.80	0.01	0.10	0.08	3.50
	480.50	24.03	0.08	2.40	0.10	3.00	0.02	0.40	0.02	1.00
	426.10	21.31	0.09	2.60	0.09	2.70	0.02	0.50	0.04	1.70
	435.80	21.79	0.10	3.10	0.12	3.90	0.04	1.00	0.08	3.40
	419.00	20.95	0.07	2.10	0.11	3.40	0.08	2.50	0.16	6.60
Media	440.35	22.02	0.09	2.68	0.09	2.76	0.04	0.90	0.07	3.24
LOTE 3	447.60	22.38	0.02	0.10	0.04	0.80	0.04	1.20	0.20	8.10
	469.60	23.48	0.02	0.30	0.04	0.80	0.05	1.40	0.06	2.60
	435.00	21.75	0.02	0.10	0.04	1.10	0.04	0.90	0.06	2.80
	453.60	22.68	0.05	1.30	0.18	5.90	0.12	3.90	0.21	8.70
	486,30	24,32	0,05	1,20	0.11	3.30	0.05	1.40	0.03	1.40
Media	461,13	23,06	0,03	0,60	0.08	2.38	0.06	1.76	0.11	4.72

Figura 40. Perfil de elución de las muestras de cemento con microcápsulas de alginato con rifampicina (valores medios para cada lote). CC: concentración

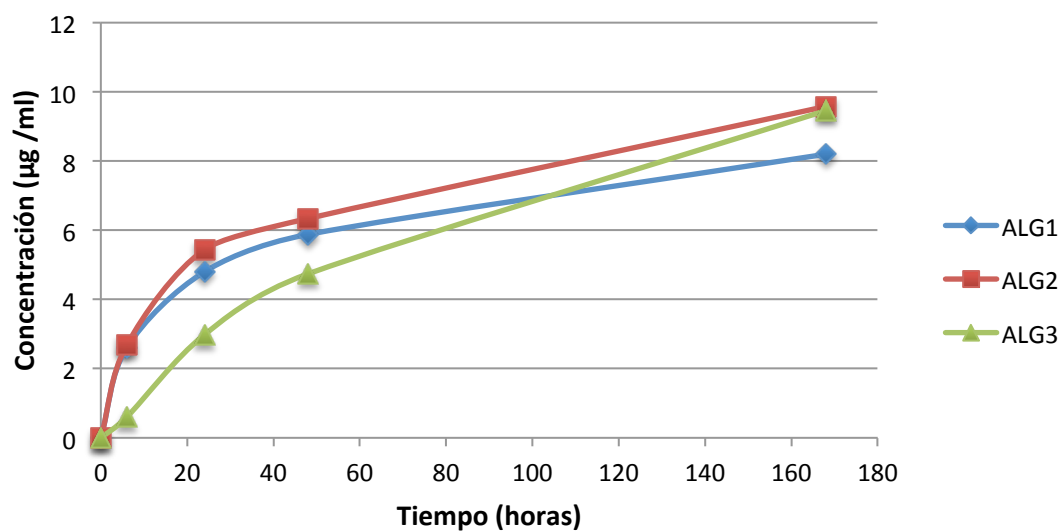


Tabla 47. Ensayos de flexión del cemento control (cemento sin rifampicina). *Rotura de la probeta por burbuja. Fmáx: fuerza máxima

Ensayo	Fmáx (N)	Tensión (MPa)	Módulo (Mpa)
CONTROL1_1	177.73	51.37	2809.37
CONTROL1_2	230.05	55.98	2778.77
CONTROL1_3*			
CONTROL1_4*			
CONTROL1_5	171.97	51.31	2047.33
CONTROL2_1*			
CONTROL2_2	207.52	58.52	3062.67
CONTROL2_3	203.67	55.43	3175.62
CONTROL2_4	191.4	55.33	3512.78

Tabla 48. Ensayos de flexión del cemento con rifampicina sin microencapsular. *Rotura de la probeta por burbuja. F_{máx}: fuerza máxima

Ensayo	F_{máx} (N)	Tensión (MPa)	Módulo (Mpa)
RIF1_1	169.43	46.31	2370.76
RIF1_2	182.44	48.68	2246.56
RIF1_3	178.64	47.17	2288.86
RIF1_4	154.76	41.38	2353.55
RIF1_5	159.11	45.06	2289.38
RIF2_1	147.04	46.83	2354.76
RIF2_2*			
RIF2_3	182.4	52.45	2768.98
RIF2_4	145.2	46.85	2607.08
RIF2_5	160.14	39.60	2057.34

Tabla 49. Ensayos de flexión del cemento con microcápsulas de PHBV. *Rotura de la probeta por burbuja. F_{máx}: fuerza máxima

Ensayo	F_{máx} (N)	Tensión (MPa)	Módulo (Mpa)
PHBV_3_1*			
PHBV_3_2*			
PHBV_3_3	199.82	57.63	3838.08
PHBV_3_4	205.43	49.66	2534.22
PHBV_3_5	192.48	49.95	2699.19
PHBV_9_1	153.84	42.48	3344.03
PHBV_9_2*			
PHBV_9_3	223.92	58.15	3174.67
PHBV_8_1	147.37	45.75	3129.18
PHBV_8_2	155.50	42.94	2814.28
PHBV_8_3*			
PHBV_8_4	187.35	49.13	2675.52

Tabla 50. Ensayos de flexión del cemento con microcápsulas de alginato. *Rotura de la probeta por burbuja. Fmáx: fuerza máxima

Ensayo	Fmáx (N)	Tensión (MPa)	Módulo (Mpa)
ALG_4_1	152.02	41.52	3036.83
ALG_4_2	172.34	46.33	2538.98
ALG_4_3	169.25	43.41	3094.51
ALG_4_4	158.11	41.72	2654.96
ALG_5_1	183.78	48.61	3104.8
ALG_5_2	167.35	44.68	3026.96
ALG_5_3	178.84	45.23	3132.55
ALG_5_4*			
ALG_5_5	189.92	46.25	3080.51
ALG_3_1	145.51	35.74	3214.48
ALG_3_2	230.79	53.38	3136.31
ALG_3_3	191.03	49.45	3127.01
ALG_3_4	177.56	41.94	3178.32
ALG_2_1	186.61	43.60	2575.33
ALG_2_2	169.92	43.36	2724.05
ALG_2_3	188.52	47.23	2796.14
ALG_2_4	169.14	43.03	2577.8

Tabla 54. Ensayos de flexión del cemento control, a los 45 minutos de la fabricación de las probetas. Fmáx: fuerza máxima

Ensayo	Fmáx (N)	Tensión (MPa)	Módulo (Mpa)
CONTROL_1	200.44	50.84	2324.52
CONTROL_2	198.27	49.46	2288.44
CONTROL_3	180.08	49.99	2387.51
CONTROL_4	215.35	53.44	2330.1

Tabla 55. Ensayos de flexión del cemento con rifampicina sin encapsular, a los 45 minutos de la fabricación de las probetas. F_{máx}: fuerza máxima

Ensayo	F_{máx} (N)	Tensión (MPa)	Módulo (Mpa)
RIF_1	81.29	16.51	692.05
RIF_2	116.39	25.85	1138.3
RIF_3	74.69	18.02	740.67
RIF_4	91.64	31.09	1245.48

Tabla 56. Ensayos de flexión del cemento con microcápsulas de PHBV, a los 45 minutos de la fabricación de las probetas. F_{máx}: fuerza máxima

Ensayo	F_{máx} (N)	Tensión (MPa)	Módulo (Mpa)
PHBV_1	146.98	36.95	1617.29
PHBV_2	120.77	35.05	1720.84
PHBV_3	159.65	40.47	1941.48
PHBV_4	169.13	44.97	2096.96

Tabla 57. Ensayos de flexión del cemento con microcápsulas de alginato, a los 45 minutos de la fabricación de las probetas. F_{máx}: fuerza máxima

Ensayo	F_{máx} (N)	Tensión (MPa)	Módulo (Mpa)
ALG_1	186.36	45.59	2207.45
ALG_2	149.45	39.36	2323.59
ALG_3	138.65	36.34	1942.35

Tabla 58. Diámetros de los halos de inhibición en cada una de las muestras y lotes (medidos por tres observadores independientes), medidos en milímetros

	Halos de inhibición (mm)
Grupo 1 (sin microcápsulas), lote 1	
- Observador 1	5
- Observador 2	6
- Observador 3	5
Grupo 1 (sin microcápsulas), lote 2	
- Observador 1	14
- Observador 2	13
- Observador 3	13
Grupo 2 (alginato), lote 1	
- Observador 1	26
- Observador 2	23
- Observador 3	25
Grupo 2 (alginato), lote 2	
- Observador 1	18
- Observador 2	17
- Observador 3	18
Grupo 2 (alginato), lote 3	
- Observador 1	21
- Observador 2	19
- Observador 3	20
Grupo 3 (PHBV), lote 1	
- Observador 1	5
- Observador 2	4
- Observador 3	5
Grupo 3 (PHBV), lote 2	
- Observador 1	8
- Observador 2	9
- Observador 3	8
Grupo 3 (PHBV), lote 3	
- Observador 1	2
- Observador 2	1
- Observador 3	2